

Departement für Nutztiere
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Dr. h. c. U. Braun

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. C. Gerspach

**Untersuchung des Lipidoms und des Metaboloms von Kühen während der
Transitphase und Vergleich zwischen unterschiedlichen
Leberversfettungsgraden**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Claudine Bieli
Tierärztin
von Selzach, SO

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent
Prof. Dr. H. P. Nägeli, Korreferent

Zürich, 2015

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. SUMMARY	7
3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	8
4. LITERATURÜBERSICHT	10
4.1. Transitphase	10
4.1.1. Physiologie und Erkrankungen während der Transitphase	11
4.1.1.1. Futteraufnahme	11
4.1.1.2. Pansen	12
4.1.1.3. Kalziummetabolismus	13
4.1.1.4. Fruchtbarkeit	14
4.1.1.5. Immunsuppression	14
4.2. Fettlebersyndrom	15
4.2.1. Energie- und Fettstoffwechsel beim Wiederkäuer	16
4.2.2. Pathogenese der Leberverfettung	17
4.2.3. Pathologie	19
4.2.4. Risikofaktoren	20
4.2.5. Klinische Befunde beim FLS	20
4.2.6. Diagnostik	20
4.2.7. Schweregrade der Leberverfettung	22
4.2.8. Therapie und Prognose	22
4.3. Metabolomik	23
4.3.1. Lipidomik	24
4.3.2. Zelluläres Lipidom	24
4.4. Chromatographie	24
4.5. Massenspektrometrie	25
4.5.1. Ionenquelle	25
4.5.2. Analysatoren	26

5. MATERIAL UND METHODIK	27
5.1. Tiere	27
5.1.1. Management und Haltung der Tiere	27
5.2. Entnahme von Blutproben und Leberbiopsien	28
5.2.1. Weitere Erhebungen	28
5.3. Probengewinnung	29
5.3.1. Blutproben	29
5.3.2. Leberbiopate	30
5.4. Histologie Leberbiopate	30
5.5. Lipidomik	31
5.5.1. Lipidextraktion	31
5.5.2. Lipiddetektion und Lipidanalyse	33
5.5.3. Metabolomik	34
5.5.4. Verarbeitung der Rohdaten und Metabolitenidentifikation	35
5.6. Messung von NEFA und BHB	36
5.6.1. NEFA	36
5.6.2. BHB	37
5.7. Statistische Auswertung	38
5.8. Zusammenarbeit mit anderen Instituten und Abteilungen der Universität Zürich	39
5.9. Tierversuchsbewilligung	40
6. ERGEBNISSE	41
6.1. Versuchstiere	41
6.2. Entnahmedaten der Blutproben	41
6.3. Leberbiopsien	42
6.4. BCS	43

6.5. NEFA- und BHB-Bestimmungen	44
6.5.1. Nicht-veresterte Fettsäuren-Konzentrationen	44
6.5.2. β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen	47
6.5.3. Vergleich der BHB- und NEFA-Konzentrationen	48
6.6. Zusammenhang zwischen den NEFA- / BHB-Konzentrationen und dem Leberverfettungsgrad	50
6.7. Ergebnisse der Lipidomik	51
6.8. Ergebnisse der Metabolomik	61
7. DISKUSSION	64
7.1 Versuchsdurchführung	64
7.1.1. Wahl der Versuchstiere	64
7.1.2. Probenentnahme und -verarbeitung	65
7.2. Gruppeneinteilung	66
7.3. Leberbiopsie	66
7.4. Lipidextraktion	67
7.5. Einflüsse des experimentellen Designs auf das Lipidom	68
7.6. NEFA-Bestimmungen	68
7.7. BHB-Bestimmungen	69
7.8. Versuchsergebnisse - BCS, NEFA und BHB	69
7.8.1. Verlauf des BCS	69
7.8.2. Verlauf der NEFA- und BHB-Konzentrationen	70
7.8.2.1. Diskussion der Versuchsergebnisse	70
7.8.2.2. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	70
7.8.3. NEFA und Leberhistologie	71
7.9. Lipidomik und Metabolomik	72
7.9.1. Lipidomik	72
7.9.1.1. Vorgehen Lipidomik	72
7.9.1.2. Diskussion der Versuchsergebnisse	73

7.9.1.3. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	74
7.9.1.3.1. Unterschiede zwischen den Verfettungsgraden	74
7.9.1.3.2. Verlauf während der Transitphase	76
7.9.2. Metabolomik	76
7.9.2.1. Vorgehen Metabolomik	76
7.9.2.2. Diskussion der Versuchsergebnisse	76
7. 10. Schlussfolgerungen	77
8. LITERATURVERZEICHNIS	79
9. DANKSAGUNG	
10. LEBENSLAUF	
11. ANHANG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäuren
AST	Aspartat Aminotransferase
BCS	Body Condition Score
BGA	Between Group Analysis
BHB	β -Hydroxybutyrat
CoA	CoEnzym-A
CPT-1	Carnitin-Palmytoil-Transferase-1
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FLS	Fettlebersyndrom
FS	Fettsäuren
GPAT	Glycerophosphat-Acyltransferase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IS	Interner Standard
LDL	Low-Density Lipoprotein
MALDI	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometer
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylläther
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Nicht-veresterte Fettsäuren (Non-esterified Fatty Acids)
OCT	Ornithin-Carbamoyl-Transferase
TAG	Triazylglyzerole
TOF	Time of Flight
UPLC	Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Potenzial der Lipidomik- und Metabolomik-Methoden wurde zur Auffindung von Biomarkern für das Fettlebersyndrom beim Rind untersucht. Plasmaproben von 12 Kühen aus demselben Bestand, die zu Beginn der Studie hochträchtig waren, wurden analysiert. Dies geschah, um Lipide und Plasmametaboliten zu identifizieren, die sich eignen, um zwischen verschiedenen Erkrankungsgraden bzw. zwischen gesund und erkrankt, zu unterscheiden. Ebenso wurde der peripartale Verlauf des Lipidoms eruiert. Die Blutproben wurden mit Leberbiopsien derselben Tiere verglichen, um den Krankheitszustand der Tiere bezüglich FLS zu kennen. Zusätzlich wurde der Verlauf der Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat und von nicht-veresterten Fettsäuren bestimmt. Die Blutprobenentnahme erfolgte, im Abstand von je einer Woche, zu zwei Zeitpunkten vor und zu fünf Zeitpunkten nach der Geburt. Bei der Auswertung der Lipidomik- und Metabolomik-Daten wurden zwischen den einzelnen Schweregraden nur postpartal Unterschiede in der Gruppenanalyse festgestellt. Dabei konnte ein Tier mit histologisch normaler Leber anhand des Lipidoms/Metaboloms deutlich von den anderen Tieren abgegrenzt werden. Zudem zeigten sich deutliche Unterschiede im peripartalen Lipidomvergleich. Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Transitphase Lipide wie Cholesterole, Phosphocholine und Lysophosphocholine, mit Ausnahme des Zeitpunkts um die Geburt, stets in ihren Konzentrationen zunahmen und Triacylglycerole nur vor der Geburt teilweise wenig zunahmen und nach der Geburt stark absanken und auch tief blieben. Im Metabolom waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten sichtbar. Hingegen konnten dort drei unterschiedliche Metabolomgruppen festgestellt werden.

Für die peripartalen Unterschiede im Lipidom waren 40 Massen verantwortlich, für diejenigen zwischen den histologischen Schweregraden 20 Massen.

2. SUMMARY

The potential of lipidomic and metabolomic methods to identify biomarkers of fatty liver disease in cows was investigated. Plasma samples of 12 cows from the same dairy farm, which were late pregnant at the beginning of the study, were analyzed. The purpose was to identify lipids and metabolites in plasma, suited to distinguish between healthy and ill animals as well as different degrees of severity. The peripartal course of the lipidome was investigated. The plasma samples were compared with liver biopsy samples of the same animals to determine the degree of fatty liver disease. Additionally, the concentration of β -hydroxybutyrate and non esterified fatty acids was measured. Blood samples were collected from the jugular vein at -14, -7, 0, +7, +14, +21 and +28 days relative to parturition. Lipidomic and metabolomic data revealed only postpartal differences between the grades of fatty liver in the group analysis. Thereby, the lipidome and the metabolome of one animal with histologically normal liver could be marked off clearly from the other animals. Furthermore, there were clear differences in the lipidomes during the peripartal period. It could be demonstrated that lipids, like cholesteroles, phosphocholines and lysophosphocholines, constantly increased in their concentration during the transition period, except from the moment around parturition. Triacylglycerole concentrations changed slightly ante partum and decreased significantly at the day of parturition and did not change for the rest of the study. There were no differences in the metabolome during the course of the study. However, three different metabolomic groups could be distinguished.

There were 40 different masses responsible for the peripartal differences in the lipidom. Twenty masses were responsible for the histological differences between the livers.

3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das Fettlebersyndrom (FLS) ist eine wichtige metabolische Erkrankung während der Früh lactation von Milchkühen (BOBE et al., 2004). Es geht mit weiteren Erkrankungen, herabgesetzter Immunfunktion und reduzierter Fruchtbarkeit einher (GEELEN und WENSING, 2006; BOBE et al., 2008). Die Pathogenese steht eng in Zusammenhang mit der Übergangsphase von der Hochträchtigkeit zur Laktation. Während dieser Zeit erfahren die Kühe eine negative Energiebilanz (NEB) und die Aufnahme von Lipiden durch die Leber übersteigt deren Fähigkeit, Lipide zu oxidieren und zu sezernieren (BOBE et al., 2004). Überschüssige Lipide werden als Triacylglycerole (TAG) in den Hepatozyten gespeichert. Sie sind mit einer reduzierten metabolischen Funktion der Leber assoziiert (DRACKLEY, 1999). Aufgrund hoher Tierarztkosten, längeren Kalbeintervallen und verkürzter Lebensdauer der betroffenen Tiere ist diese Krankheit weltweit von wichtiger wirtschaftlicher Bedeutung (BOBE et al., 2004). Die Prävalenz des FLS beträgt in Hochleistungsherden bis über die Hälfte aller Tiere (JORRITSMA et al., 2003). Erkrankte Tiere sprechen auf eine Therapie nur schlecht an und die Mortalitätsrate kann bis 50 % betragen (ADEWUYI et al., 2005). Die bisherigen Mittel zur Diagnose eines FLS sind limitiert. Es gibt keine klinischen Symptome, die einzig bei diesem Krankheitsbild auftreten.

Die Entnahme einer Leberbiopsie, mit anschliessender Bestimmung des Fettgehalts, ist bisher die einzige verlässliche Methode zur Diagnose und Bestimmung des Schweregrads einer Fettleber beim Rind (KALAITZAKIS et al., 2010). Dies ist jedoch ein invasiver chirurgischer Vorgang, der für eine Herdenüberwachung nicht praktikabel ist (STARKE et al., 2010) und wegen dem das Wohlbefinden der betroffenen Tiere kurzzeitig beeinträchtigt ist (MOLGAARD et al., 2012).

Ziel dieses Projektes war es, Veränderungen im Lipidom und im Metabolom von gesunden Kühen und von Kühen mit einem FLS während der Transitphase zu untersuchen und so ein metabolisches Profil zu erstellen, das mit dem Auftreten

einer Leberverfettung bei Kühen in der Transitphase korreliert. Die Kenntnis des metabolischen Profils könnte das Verständnis für die Pathophysiologie dieses wichtigen Krankheitskomplexes verbessern. Zudem besteht die Möglichkeit, einen potentiellen Biomarker für die Diagnostik der Leberverfettung zu finden, der mithilfe, ein FLS auf Einzeltier- sowie auf Bestandesebene zu diagnostizieren, den Schweregrad der Verfettung zu bestimmen, eine Prognose für das Einzeltier zu formulieren und die Therapie der Krankheit zu überwachen.

Der metabolomische Ansatz wurde aufgrund der Annahme gewählt, dass einer hepatischen Lipidose Veränderungen im Plasmalipidom und -metabolom vorausgehen.

Folgende Fragen sollten nach den Untersuchungen beantwortet werden:

- Entstehen während der Transitphase von Kühen Veränderungen in deren Lipidom?
- Liegen Unterschiede zwischen dem Lipidom von gesunden Kühen und demjenigen von Kühen mit FLS vor?
- Gibt es Unterschiede im Lipidom bei verschiedenen Schweregraden einer Leberverfettung?

Zusätzlich zum Lipidom wurde der Verlauf der Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat (BHB) und von nicht-veresterten freien Fettsäuren (NEFA) während der Transitphase untersucht, um mögliche Zusammenhänge mit dem Auftreten eines FLS feststellen zu können.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. Transitphase

Die Transitphase der Kuh erstreckt sich über die Zeit von drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Geburt (GRUMMER, 1995; GOFF und HORST, 1997; HUIZZLEY und OVERTON, 2008; WANG et al., 2012) und beschreibt den Übergang vom tragenden, nicht laktierenden zum nicht tragenden, laktierenden Status (SPAIN und SCHEER, 2002). Sie wird durch zahlreiche physiologische, metabolische und endokrine Veränderungen charakterisiert (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999; ABDEL-RAHEEM et al., 2010). Der Erfolg der Transitphase bestimmt die Rentabilität einer Kuh während der folgenden Laktationsperiode (DRACKLEY, 1999). Der Energiebedarf für Körperfunktionen und Milchproduktion ist bei Hochleistungsmilchkühen nach der Geburt bis zu drei Mal höher als präpartal (DRACKLEY et al., 2001). Während der Frühlaktation ist die Menge der aufgenommenen Nährstoffe nicht ausreichend, um die energetischen Bedürfnisse der Kuh zu decken, da die Menge des aufgenommenen Futters zu Beginn der Laktation nur langsam steigt und ihren Höhepunkt erst einige Wochen nach dem Zeitpunkt der höchsten Milchleistung erreicht (INGVARTSEN und ANDERSEN, 2000; GRUMMER et al., 2004; STENGÄRDE et al., 2008). Auf diese Weise entsteht eine NEB, die durch die nutritive Priorisierung der Milchdrüse noch verstärkt wird (LEROY et al., 2008; ANDRES CONTRERAS und SORDILLO, 2011). Aus diesem Grund ist die Transitphase, insbesondere die Frühlaktation, durch die Mobilisation von Körperreserven verschiedener Gewebe, besonders des Fettgewebes, charakterisiert (RUKKWAMSUK et al., 1999b; INGVARTSEN und ANDERSEN, 2000). Die Zeit um die Geburt ist zudem mit einer erhöhten Inzidenz an Krankheiten wie Milchfieber, Nachgeburtsverhalten, Metritis, Ketose, Labmagenverlagerung, Lahmheit und klinischer Mastitis assoziiert (GOFF und HORST, 1997). 30 - 50 % aller Milchkühe sind während der

Transitphase von einer metabolischen oder infektiösen Krankheit betroffen (LEBLANC, 2010).

Um die Zeit der Geburt erfahren im Grunde alle Milchkühe eine Insulinresistenz, eine Hypokalzämie und eine bakterielle Kontamination des Uterus (LEBLANC, 2010). All diese Faktoren und zusätzlich starke Veränderungen der zirkulierenden Konzentrationen an Progesteron, Östrogenen und Kortisol bewirken eine starke Reduktion der Immunfunktion, besonders der neutrophilen Granulozyten (GOFF und HORST, 1997; LEBLANC, 2010).

4.1.1. Physiologie und Erkrankungen während der Transitphase

Verschiedene physiologische Funktionen müssen während der Transitphase aufrechterhalten werden, damit Krankheiten verhindert werden können. Dazu gehören die Adaptation des Pansens an die energiereiche Laktationsfütterung, die Erhaltung der Normokalzämie und die Konservierung eines starken, widerstandsfähigen Immunsystems (GOFF und HORST, 1997).

4.1.1.1. Futteraufnahme

Ein 20 - 40 prozentiger Rückgang der Futteraufnahme während der letzten drei Trächtigkeitswochen beeinträchtigt die Fähigkeit der Kuh, sich an physiologische Veränderungen in der Transitphase anzupassen (HAYIRLI et al., 2002). HAYIRLI et al. (2002) nannten als wichtigste Faktoren, welche die Trockensubstanz-Aufnahme kurz ante partum beeinflussen die Parität, den Body Condition Score (BCS) und die Zusammensetzung der Ration. Die Aufnahme der Trockensubstanz ist mit der Parität und dem Anteil schnell abbaubarer Kohlenhydrate in der Ration positiv (HAYIRLI et al., 2002) und mit dem BCS (HAYIRLI et al., 2002; MCART et al., 2013), dem Anteil an Rohfasern in der Ration und dem Trächtigkeitsstadium negativ korreliert (HAYIRLI et al., 2002).

Zu Beginn der Laktationsperiode gerät die Kuh in eine noch stärkere NEB. Durch Ketonkörper im Blut wird die Glukoneogenese beeinträchtigt, sodass eine Hypoglykämie erfolgt (GOFF und HORST, 1997).

Der BCS ist eine gute Möglichkeit zur Überprüfung der Energiebilanz und eine Methode, mit der eine schnelle, einfache und relativ präzise Schätzung des Körperfettanteils vorgenommen werden kann. Er reflektiert nutritive und metabolische Veränderungen in den vorangegangenen Lebenswochen einer Kuh (LEBLANC, 2010). Ein idealer BCS um die Geburt beträgt nach LEBLANC (2010) 3.0 bis 3.5, nach LEAN et al. (2013) weniger als 3.5 und nach ROCHE et al. (2013) 3.0 für Kühe und 3.25 für Rinder (auf einer Skala von 1 bis 5). Kühe, die in der Früh-laktation mehr als einen BCS-Punkt verlieren, haben ein erhöhtes Krankheitsrisiko (LEBLANC, 2010).

4.1.1.2. Pansen

Zu Beginn der Galtphase sollen die Kühe im Vergleich zur Laktation mit einer Ration mit reduzierter Energiedichte und erhöhtem Rohfaseranteil versorgt werden (GOFF und HORST, 1997; SPAIN und SCHEER, 2002; GRUMMER et al., 2004). Dies beeinflusst die Pansenmikroben. Es sinkt die Anzahl der Bakterien, die Laktat produzieren und konvertieren, also aus Laktat Azetat, Propionat oder langkettige Fettsäuren (FS) produzieren (GOFF und HORST, 1997; KLIEVE et al., 2003). Hingegen steigt die Anzahl der Bakterien, die Zellulose spalten (GOFF und HORST, 1997). Zusätzlich verkürzen sich die Pansenpapillen (GOFF und HORST, 1997; SPAIN und SCHEER, 2002) und die Aufnahmekapazität der Pansenmukosa für flüchtige Fettsäuren wird reduziert. Wird die Ration vor der Geburt zu schnell auf eine hochenergetische Laktationsdiät umgestellt, besteht das Risiko einer Pansenazidose (GOFF und HORST, 1997): Energiedichte Rationen führen, durch verringerte Kaudauer und Speichelproduktion, zu starker Bildung organischer Säuren und zu reduzierter Pansenpufferung, was zu einer Senkung des Pansen-pH-

Werts führen kann. Geschieht dies über einen längeren Zeitraum, entsteht eine subakute Pansenazidose. Dieser Prozess beeinflusst die Futteraufnahme, die Milchproduktion und den Milchfettgehalt sowie die Pansenmikroflora und Verdauung. Es kann zu Durchfall, Klauenrehe und einer Schädigung der Pansenschleimhaut kommen. Die Schleimhautschädigung führt aufgrund der beeinträchtigten Barrierenfunktion zu einer Bakterientranslokation (v. a. *Fusobacterium necrophorum* und *Trueperella pyogenes*) aus dem Pansen ins Portalvenenblut und nachfolgend zur Bildung von Leberabszessen. Von der Leber können die Bakterien in weitere Organe streuen (PLAIZIER et al., 2009).

4.1.1.3. Kalziummetabolismus

Die meisten Kühe entwickeln zwischen 24 h ante und 72 h post partum eine Hypokalzämie (RUKKWAMSUK et al., 1999b; DIRKSEN et al., 2006), wobei die Inzidenz mit der Parität steigt. Obese Kühe haben ein erhöhtes Risiko, an Milchfieber zu erkranken, da die durch die Überkonditionierung hervorgerufene verminderte Futteraufnahme den Gehalt des zur Verfügung stehenden Kalziums reduziert (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Kühe, die an Milchfieber erkranken, haben eine höhere Plasma-Kortisol-Konzentration (HORST und JORGENSEN, 1982). Dies kann eine um die Geburt vorhandene Immunsuppression noch verstärken. Zusätzlich resultiert aus einer Hypokalzämie ein Verlust an Muskeltonus im Uterus und im Zitzensphinkter, welcher, zusammen mit der erhöhten Kortisolkonzentration, für die hohe Inzidenz an Nachgeburtsverhalten und Mastitis bei Kühen mit Milchfieber verantwortlich sein könnte. Eine Hypokalzämie hemmt auch die Sekretion von Insulin (WOLLHEIM und SHARP, 1981; GOFF und HORST, 1997), was zu verminderter Glukoseaufnahme ins Gewebe führt und unter anderem die abomasale Kontraktilität reduziert (GOFF und HORST, 1997).

4.1.1.4. Fruchtbarkeit

Eine NEB bei Milchkühen ist post partum mit tiefen Plasma-Insulinkonzentrationen assoziiert (BEAM und BUTLER, 1997; HOLTENIUS et al., 2003). Insulin spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus und im reproduktiven System. Es stimuliert die Aufnahme von Glukose in die Zellen und fördert indirekt die Synthese von Wachstumshormon durch die Granulosa-Zellen (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Eine NEB reduziert die hypothalamische Sekretion von Gonadotropin-Releasing-Hormon und die hypophysäre Sekretion von Gonadotropin (NEBEL und MCGILLIARD, 1993). Die Beziehung zwischen einer NEB und der Fruchtbarkeit hängt zudem vom Insulin-like Growth Factor (IGF)-System ab. In den Ovarien haben die IGF wichtige Effekte auf die Entwicklung von Follikeln und auf die Steroidsynthese (EINSPANIER et al., 1990; RUKKWAMSUK, 1999b). In einer positiven Energiebilanz haben Kühe höhere Konzentrationen an IGF-1 im Blut (SPICER et al., 1990; COMIN et al., 2002; GRABER et al., 2010; PIECHOTTA et al., 2013) und sezernieren mehr Progesteron während der Lutealphase als in einer NEB (SPICER et al., 1990). IGF-1 kann nach Piechotta et al. (2012) auch der Abschätzung für das Risiko postpartaler Produktionskrankheiten dienen. Die Ovarfunktion wird durch erhöhte Konzentrationen an Ammoniak, NEFA und Harnstoff im Blut gestört (JORRITSMA et al., 2003). Auch eine verspätete Uterusinvolution, z. B. infolge Endometritis, kann die Fruchtbarkeit negativ beeinflussen (SHELDON et al., 2002). Das Zeigen von Brunstsymptomen ist abhängig von der Östrogenkonzentration im Blut. Bei der Synthese von Östrogen wird Cholesterol benötigt. Kühe mit einem höheren TAG-Gehalt in der Leber zeigten einen tieferen Cholesterolgehalt der Very Low-Density-Lipoproteine (VLDL) als Kontrollkühe (JORRITSMA et al., 2000).

4.1.1.5. Immunsuppression

GOFF und HORST (1997) vermuteten einen negativen Einfluss des Plasma-Östrogens und der Sekretion von fötalem Kortisol um die Geburt auf die

zellvermittelte Immunität. Zusätzlich wurden auch chronische Mängel an Energie, Proteinen, Mineralien oder Vitaminen in Zusammenhang mit erhöhter Krankheitsanfälligkeit gebracht (GOFF und HORST, 1997), da die für das Immunsystem wichtigen Vitamine A und E um die Geburt aufgrund der Kolostrumbildung stark absinken (GOFF und STABEL, 1990).

Die Phagozytoseleistung von neutrophilen Granulozyten ist bei Kühen in der ersten Laktationswoche reduziert (GOFF und HORST, 1997). Zudem produzieren die neutrophilen Granulozyten bei Kühen mit Mastitis oder Metritis in der Transitphase weniger Superoxid-Ionen und ihre Chemotaxis ist schwächer als bei gesunden Kühen (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Tiere mit FLS zeigen eine reduzierte Phagozytose-Leistung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, eine verminderte Kapazität, Entzündungsmediatoren frei zu setzen und eine geringere Menge an Leukozyten, die in ein infiziertes Euter migrieren (BOBE et al., 2004). Zusätzlich sind um die Geburt die Lymphozytenfunktion sowie die Serumkonzentrationen anderer Komponenten des Immunsystems (Immunoglobuline) herabgesetzt (KEHRLI et al., 1990). SORDILLO und RAPHAEL (2013) sahen in einer unzureichenden Immunantwort die Hauptverbindung zwischen metabolischen und infektiösen Erkrankungen während der Transitphase.

4.2. Fettlebersyndrom

Ein FLS entwickelt sich, wenn die Leber mehr Lipide aufnimmt als sie oxidieren oder sezernieren kann. Es tritt besonders in den ersten vier Wochen post partum auf (GRUMMER, 1993; HERDT, 2000; REHAGE et al., 2006). Ein wichtiger Grund dafür ist die ungenügende Futteraufnahme, um die kurz vor der Geburt steigenden Energiebedürfnisse für die eigene Erhaltung und die einsetzende Milchproduktion zu decken (GOFF und HORST, 1997). Das FLS kann auf der Basis vom

prozentualen Anteil an TAG in der Leber, assoziiert mit reduziertem Gesundheitsstatus, sowie reduzierter Produktivität und Reproduktionsleistung definiert werden (BOBE et al., 2004).

4.2.1. Energie- und Fettstoffwechsel beim Wiederkäuer

Der Metabolismus der Wiederkäuer unterscheidet sich von dem der Monogastrier. Wiederkäuer können Zellulose und Nicht-Protein-Stickstoff durch mikrobielle Fermentation metabolisieren, jedoch nur beschränkt Glukose aus dem Verdauungstrakt absorbieren (GOFF und HORST, 1997; ADEWUYI et al., 2005; DE KOSTER und OPSOMER, 2013). Obwohl die Mikroorganismen im Pansen der Wiederkäuer für Monogastrier unbrauchbare Zellulose zu Glukose aufspalten können, fermentieren sie alle Kohlenhydrate zu den flüchtigen Fettsäuren Azetat, Butyrat und Propionat (ADEWUYI et al., 2005; GEELEN und WENSING, 2006). Von diesen FS steht nur Propionat für die hepatische Glukoneogenese zur Verfügung. Der Hauptteil des Energiebedarfs wird bei Wiederkäuern durch die Oxidation von Azetat und Butyrat gedeckt. Ihr Energiemetabolismus ist an die Verwendung flüchtiger Fettsäuren anstelle von Kohlenhydraten angepasst. Dies hat Auswirkungen auf die Präsenz von Enzymen in der Leber, im Fettgewebe und im Euter. Da nur wenig Glukose die Leber via Portalvene erreicht, ist anzunehmen, dass die Glykogensynthese in der Wiederkäuerleber eine untergeordnete Rolle spielt (GEELEN und WENSING, 2006). Diese und weitere Besonderheiten im Kohlenhydratstoffwechsel von Wiederkäuern sind wichtig für das Verständnis der Entstehung metabolischer Erkrankungen (GEELEN und WENSING, 2006). Die Diskrepanz zwischen der über den Darm aufgenommenen Energie und dem Glukoseverbrauch der Kuh muss durch verstärkte Glukoneogenese aus intestinal absorbierten Aminosäuren (AS) und aus endogenen Substraten wie AS, Laktat und Glycerol generiert werden. Beim Wiederkäuer ist Propionat (aus dem Pansen und zu einem geringeren Teil aus der Dickdarmfermentation) quantitativ das wichtigste

Substrat für die Glukoneogenese. Der Propionat-Metabolismus der Leber wird während der Transitphase verstärkt. Alle AS ausser Leucin und Lysin können einen Nettobeitrag zur Glukoneogenese beisteuern. Überschüssige AS werden, überwiegend in der Leber, katabolisiert und der entstehende Stickstoff wird in Harnstoff umgewandelt und ausgeschieden. Als Signal für die endokrine Regulation der Glukoneogenese können Insulin, Glukagon, Somatotropin und Kortisol wirken (DRACKLEY et. al., 2001). Glukagon stimuliert die Glukoneogenese (DONKIN und ARMENTANO, 1995), während Insulin sie hemmt (BROCKMAN, 1990). Glukokortikoide fördern glukoneogenetische Prozesse (DRACKLEY et al., 2001). Die Leber, das Fettgewebe und während der Laktation auch die Milchdrüse sind die Hauptorte des Fettsäurestoffwechsels. Alle diese Gewebe können Fettsäuren neu synthetisieren und zu TAG verestern. Bei Wiederkäuern ist Azetat das Hauptsubstrat für die Fettsäuresynthese. Fettsäuren sind die Hauptenergiequelle für die meisten Körpergewebe während einer NEB. Sie werden v. a. im Fettgewebe als TAG gespeichert. Sind die NEFA im Blut über längere Zeit erhöht, z. B. bei Verfettung oder in der Früh-laktation, können sich die TAG auch in anderen Geweben wie der Leber oder den Myozyten akkumulieren (VERNON, 2005).

4.2.2. Pathogenese der Leberverfettung

Ausgelöst wird die Lipolyse um den Zeitpunkt der Geburt durch eine NEB, hormonelle Veränderungen und eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems (GRUM et al., 1996; DRACKLEY et al., 2001). Zusätzlich spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle: Eine Katecholaminausschüttung (GRUM et al., 1996; HERDT, 2000; DRACKLEY et al., 2001) sinkende Konzentrationen an Plasmainsulin (HERDT, 2000; STANGASSINGER, 2011) und Plasmaglukose (HERDT, 2000; VAN DORLAND et al., 2009), eine beeinträchtigte Insulin-Empfindlichkeit des Gewebes und erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen (HERDT, 2000). Dies führt zu stark erhöhten NEFA-Konzentrationen im Blut

(GRUM et al., 1996; DRACKLEY et al., 2001). Die NEFA entstehen nach Hydrolyse von TAG durch die Aktivität der Hormon-sensitiven Lipase. In der Leber können sie auf verschiedene Weise metabolisiert werden: durch komplette Oxidation zu Kohlenstoffdioxid und Adenosintriphosphat, partielle Oxidation zu Ketonkörpern, Veresterung und Speicherung als TAG oder Veresterung und Export als VLDL (EMERY et al., 1992; GRUMMER, 2010; ALLEN und PIANTONI, 2013). Die VLDL werden v. a. zum Euter transportiert (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Ob die Fettsäuren verestert oder oxidiert werden, hängt besonders von der Aktivität der Glycerophosphat-Acyltransferase (GPAT) und der Carnitin-Palmytoil-Transferase-1 (CPT-1) ab. Die GPAT katalysiert den ersten Schritt der Fettsäureveresterung. CPT-1 katalysiert die Umwandlung von langkettigen Fettsäuren-CoA-Ester in ihr Acyl-Carnitin-Derivat. Dies erlaubt ihren Transport in die Mitochondrien, wo die Oxidation statt findet (VERNON, 2005). Zusätzlich zu den TAG werden für die Synthese von VLDL in der Leber Apoproteine, Cholesterol, Cholesterolester und Phospholipide gebraucht (GIBBONS und WIGGINS, 1995). Bei der Oxidation werden die FS zu Acetyl-CoA konvertiert. Ob dieses Acetyl-CoA in den Krebszyklus geschleust wird, hängt von der Verfügbarkeit von Oxalacetat ab, welches wiederum v. a. von der Verfügbarkeit von Propionat abhängt. Um eine Akkumulation von zu viel gebildetem Acetyl-CoA zu vermeiden, werden Ketonkörper (Aceton, Acetoacetat, BHB) gebildet (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Diese können von den Muskeln als alternative Energiequelle zu Glukose benutzt werden (EATON et al., 1996; HERDT, 2000; LEBLANC, 2010); sie liefern jedoch weniger Nettoenergie als die vollständige FS-Oxidation (ALLEN et al., 2009; LEBLANC, 2010). Eine hohe Serumkonzentration an Ketonkörpern hemmt zudem die Futteraufnahme (ALLEN et al., 2009; LEBLANC, 2010). Unter diesen Bedingungen kann die Kuh eine subklinische oder klinische Ketose entwickeln (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Ketonkörper lassen sich nachfolgend im Blut, im Urin und in der Milch nachweisen (ADEWUYI et al.,

2005). Der hepatische Export von Fettsäuren als TAG in Very-Low-Density-Lipoproteinen geschieht in der bovinen Leber langsam. Deswegen wird das meiste Fett, welches nicht oxidiert wird, als TAG in der Leber gespeichert (GRUMMER, 1993; SPAIN und SCHEER, 2002; WEBER et al., 2013). Schon 24 h post partum kann eine exzessive hepatische Speicherung von TAG auftreten (GRUMMER, 1993). Kühe unterscheiden sich im Potential, FS via VLDL aus der Leber zu exportieren (WEBER et. al., 2013). Die Leber einer überkonditionierten Kuh hat eine geringere Kapazität, Fettsäuren zu oxidieren als die einer normalgewichtigen Kuh (GOFF und HORST, 1997).

4.2.3. Pathologie

Eine exzessive Ansammlung von TAG und anderen Lipidmetaboliten in den Hepatozyten kann zu einer Schädigung der Hepatozyten führen (Zellkompression, Reduktion der Grösse und Anzahl der Zellorganellen) (BOBE et al., 2004; ANDRES CONTRERAS und SORDILLO, 2011). Fettinfiltrationen in der Leber beeinträchtigen ihre Fähigkeit, Endotoxine und Hormone zu metabolisieren (RUKKWAMSUK et al., 1999b). Exzessive Einlagerungen von TAG verursachen sowohl makro- als auch mikroskopische Veränderungen der Leber: Diese nimmt an Grösse zu, wird abgerundet und erscheint hell bis gelblich (BOBE et al., 2004). Histologisch können vergrösserte Hepatozyten, komprimierte Nuclei (VEENHUIZEN et al., 1991; BOBE et al., 2004), blasses, vakuolisiertes Zytoplasma (VEENHUIZEN et al., 1991) beschädigte Mitochondrien, aufgerautes endoplasmatisches Retikulum und eine reduzierte Anzahl Zellorganellen beobachtet werden (BOBE et al., 2004). Diese Veränderungen führen zu Zellnekrose und reduzierter Hepatozytenfunktion sowie nachfolgend zu erhöhten Konzentrationen an Leberenzymen und Gallenbestandteilen im Blutplasma.

Veränderungen assoziiert mit dem FLS betreffen auch Metaboliten und Mineralien im Blutplasma: Reduzierte Konzentrationen von Metaboliten wie z. B. Glukose

können Organfunktionen hemmen. Erhöhte Konzentrationen an Ammoniak, NEFA, BHB und Acetoacetat wirken toxisch (BOBE et al., 2004).

4.2.4. Risikofaktoren

Der Grad der Fettleber hängt unter anderem vom Alter der Tiere ab. Kühe mit hochgradigem FLS sind deutlich älter als Kontrolltiere (KALAITZAKIS et al., 2010). Überkonditionierte Kühe erfahren peripartal eine stärkere NEB als normal konditionierte Kühe und geraten erst später in der Laktation wieder in eine positive Energiebilanz (RUKKWAMSUK et al., 1999a).

Die Risikofaktoren des Fettlebersyndroms wurden in einer kürzlich erschienenen Dissertation (GUBLER, 2012) ausführlich beschrieben.

4.2.5. Klinische Befunde beim FLS

Die klinischen Befunde beim FLS wurden von GUBLER (2012) detailliert beschrieben.

4.2.6. Diagnostik

Eine erhöhte NEFA-Konzentration im Plasma ist ein Indikator für eine NEB (BOBE et al., 2004; LEBLANC, 2010). Die NEFA-Konzentration beginnt zwei bis vier Tage ante partum anzusteigen (LEBLANC, 2010). Nach ADEWUYI et al. (2005) erreicht sie ihren Peak um die Geburt und nach LEBLANC (2010) etwa drei Tage postpartal. Bei Kühen mit metabolischen Problemen beginnt der Anstieg früher und der Peak liegt höher (LEBLANC et al., 2005). Weitere Indikatoren für eine NEB sind u. a. eine erhöhte Serum-BHB-Konzentration (MILLS et al., 1986; BOBE et al., 2004; ADEWUYI et al., 2005) sowie reduzierte Plasmakonzentrationen von Glukose (MILLS et al., 1986; GRUM et al., 1996; BUTLER et al., 2003), Insulin (MILLS et al., 1986; BUTLER et al., 2003) und IGF-1 (BUTLER et al., 2003) und eine Reduktion des BCS (WILDMAN et al., 1982; OLDICK, 1999). In der Leber

sind beim FLS die Konzentration an Apo B (Hauptprotein von VLDL und Low-Density-Lipoprotein [LDL]) (GRUFFAT et al., 1996; KATOH, 2002), Protein-kinase C (posttranslationelle Modifikation von Apo A-I) und Apo A-I (KATOH, 2002) sowie Carnitin-Palmitoyltransferase (β -Oxidation und Ketogenese) (MIZUTANI et al., 1999) reduziert. Zudem nimmt die Konzentration an Plasmalipiden und Enzymen, die im Lipidtransport involviert sind, ab, was für eine reduzierte Sekretion von Lipoproteinen spricht (BOBE et al., 2004). Für Monitoring-Programme sollten NEFA-Konzentrationen in der Woche vor dem berechneten Kalbedatum und BHB-Konzentrationen in den ersten sieben Tagen post partum gemessen werden (LEBLANC, 2010). Erhöhte TAG-Konzentrationen in der Leber werden von reduzierten Konzentrationen an Energievorläufern (Citrat) (MILLS et al., 1986) und energiespeichernden Molekülen (Glykogen) (MILLS et al., 1986; VAN DEN TOP et al., 1996) begleitet. DRACKLEY et al. (1992) empfehlen, das TAG/Glykogen-Verhältnis in der Leber als diagnostischen Faktor für ein FLS zu verwenden.

Es existieren weitere biochemische Parameter im Blut, die Hinweise auf ein FLS liefern. Nach KALAITZAKIS et al. (2007) korrelierten besonders die Aspartat-Amino-Transferase (AST)-Aktivität und das totale Bilirubin im Serum stark mit dem Grad des FLS. Da die AST nicht leberspezifisch ist, empfehlen die genannten Autoren, bei erhöhter AST zusätzlich die Messung der Creatin-Kinase durchzuführen, um eine muskuläre Ursache für eine erhöhte AST auszuschliessen. Nach KALAITZAKIS et al. (2010) waren auch die Serum-Aktivität von Ornithin-Carbamoyl-Transferase (OCT) und das NEFA-Cholesterol-Verhältnis gute Indikatoren für ein FLS. Nach diesen Autoren weisen OCT-Werte über 40 U/l und ein NEFA-Cholesterol-Verhältnis > 0.4 auf ein FLS hin. Generell erlaubt jedoch kein Serumparameter allein eine sichere Diagnose. Entscheidend ist viel mehr die Kombination der verschiedenen Parameter (KALAITZAKIS et al., 2010). Bei Tieren mit diffuser Leberverfettung steigt die Echogenität des Leberparenchyms im

Ultraschall mit dem Grad der Verfettung (BRAUN, 2009). Die Leber erscheint weiss und die Abgrenzung zum umliegenden Gewebe wird erschwert. Zudem sinkt der Kontrast zwischen Leberparenchym und Blutgefässen. Eine zuverlässige Bestimmung des Fettgehalts im Lebergewebe wird mit der histologischen Untersuchung und der Messung des Fettgehalts oder der absoluten TAG-Konzentration eines Leberbiopats erreicht (BRAUN, 2009). STARKE et al. (2010) beschreiben zudem die computergestützte Ultraschalldiagnose als gutes Mittel zur Feststellung einer Leberverfettung.

4.2.7. Schweregrade der Leberverfettung

Eine Unterteilung von Schweregraden kann mittels biochemischer Bestimmung des TAG-Gehalts in der Leber oder mittels histologischer Untersuchung des Leberparenchyms durchgeführt werden (GAAL et al., 1983; KARSAI und SCHÄFER, 1984). Eine mögliche Einteilung erfolgt in gesund bzw. milde, mittelgradige oder hochgradige Verfettung und wird aufgrund des prozentualen TAG-Gehalts der Leber definiert ($< 1\%$ / $1 - 5\%$ / $5 - 10\%$ / $> 10\%$) (BOBE et al., 2004). Die Verteilung der TAG-Infiltration ist beim milden FLS begrenzt auf die zentrolobulären Anteile der Leber. Beim mittel- und hochgradigen FLS kommen zusätzlich midzonale und periportale Akkumulationen vor (VEENHUIZEN et al., 1991; KALAITZAKIS et al. 2007). Zudem zeigt sich die ganze Leber vergrössert und in schweren Fällen nekrotisch (BOBE et al., 2004).

4.2.8. Therapie und Prognose

Kühe mit hepatischer Lipidose reagieren nicht gut auf eine Behandlung. Es werden Mortalitätsraten bis 50 % beobachtet (ADEWUYI et al., 2005). BOBE et al. (2004) beschrieben zur Therapie das Anbieten von frischem, hochwertigem Heu, mässige Bewegung (fördert die Oxidation von Ketonkörpern in der Skelettmuskulatur) und zusätzlich Glukokortikoide und Glukosevorläufer wie Glycerol, welche die

Glukoneogenese in der Leber begünstigen. Bei einem hochgradigen FLS wird zu einer intravenösen Gabe von Glukose und Glukokortikoiden geraten. Propylenglykol, ein Glukosevorläufer, ist eine gute Behandlungsmöglichkeit für Kühe mit erhöhten NEFA- oder BHB-Konzentrationen (LEBLANC, 2010), da es die Plasmakonzentrationen dieser Substanzen senkt und die Blutglukosekonzentration erhöht (NIELSEN und INGVARTSEN, 2004). GORDON et al. (2013) empfehlen, 300 g Propylenglykol einmal pro Tag oral über 5 Tage zu verabreichen.

4.3. Metabolomik

Gene kodieren Proteine, die in ihrer Gesamtheit, zusammen mit Umweltfaktoren, zum Metabolitenbestand einer Zelle oder eines Gewebes zählen. Neue Methoden erlauben qualitative und quantitative Messungen auf jeder Stufe dieser sogenannten „-omics-Kaskade“ (Genom, Proteom, Metabolom) (WENK, 2005; SCHMELZER et al., 2007). ASTARITA et al. (2009) nannten die Metabolomik den Wissenszweig aller Metaboliten in einem biologischen Organismus. Nach GRIFFITHS et al. (2010) sind es Daten, welche den funktionellen Zustand eines biologischen Systems wiedergeben. Dabei kann der Zustand dieses Systems aus Metabolitenmustern von Körperflüssigkeiten erhoben werden.

4.3.1. Lipidomik

Diese Unterkategorie der Metabolomik befasst sich mit Veränderungen in der Lipidzusammensetzung, die zu Störungen eines biologischen Systems führen (ASTARITA et al., 2009). Das Ziel der Lipidomik ist es, die Rolle der Lipide in der Biologie eines lebenden Organismus zu verstehen (ROBERTS et al., 2008; ASTARITA et al., 2009). Die Lipidzusammensetzung liefert eine Übersicht des biologischen Status eines Lebewesens (ASTARITA et al., 2009). Die Lipidomik kann als systemumfassende Charakterisierung von Lipiden und ihrer Interaktion mit

anderen Biochemikalien und Zellen definiert werden (WENK, 2005; CASTRO-PEREZ et al., 2010). Zudem kann sie als Biomarker für Gesundheit oder Krankheit verwendet werden (ASTARITA et al., 2009; HU et al., 2009; KHALIL et al., 2010; LI et al., 2010; NORDSTRÖM und LEWENSOHN, 2010; JUNG et al., 2011). GUBLER (2012) konnte im Lipidom von Tieren mit und ohne Fettleibersyndrom Unterschiede im Lipidom zeigen und eine Technik zur Extraktion von Lipiden aus Blutplasma mittels *tert*-Butylmethylether etablieren.

4.3.2. Zelluläres Lipidom

Das zelluläre Lipidom beinhaltet über 1000 verschiedene Lipide (VAN MEER, 2005) und ist ein wichtiger Bestandteil des Metaboloms (DETTMER et al., 2007). Es ist als das ganze Spektrum an Lipiden in einem biologischen System definiert (SEPPÄNEN-LAAKSO und ORESIC, 2009) oder als eine umfangreiche und nicht erschöpfliche Kombination von Lipidklassen, die eine Zelle oder einen biologischen Organismus begründen (CASTRO-PEREZ et al., 2010).

Lipide sind biologische Substanzen, die hydrophob und in organischen Lösungsmitteln hochlöslich sind (CLAUSS und CLAUSS, 2005). Sie können mit organischen Lösungsmitteln aus dem Ursprungsgewebe extrahiert und danach mittels Chromatographie und Spektrometrie analysiert werden (WENK, 2005).

Die Wirkung von Fetten wird durch ihre lokale Konzentration bestimmt. Die zelluläre Lipidomik bestimmt nicht nur, welche Fette vorhanden sind, sondern auch die Konzentration von jedem Lipid in jeder spezifischen intrazellulären Lokalisation und ihre Interaktions-Partner (VAN MEER, 2005).

4.4. Chromatographie

Ein Gemisch löslicher Substanzen wird mittels Flüssigkeit oder Gas als mobile Phase über eine stationäre Phase bewegt und dabei in seine Bestandteile zerlegt. Die Wahl beider Phasen wird so getroffen, dass die zu trennenden Substanzen unterschiedliche Verteilungskoeffizienten zu diesen haben. Bezug nehmend auf die

Natur der beweglichen Phase spricht man von Flüssigkeitschromatographie, welche die Verfahren der Säulen-, Papier-, Dünnschicht- und Gelchromatographie einschliesst, und von Gaschromatographie (RICHTER, 2003).

4.5. Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer dient der Strukturaufklärung von organischen Molekülen (GEY, 2008). Es lässt sich in vier Funktionsabschnitte unterteilen: Probenzuführung (Einlass), Ionenerzeugung (Ionenquelle), Ionentrennung und Detektion (Analysator) und Datenverarbeitung (HESSE et al., 2012).

Zu untersuchende Moleküle werden mittels einer Ionenquelle in positiv und negativ geladene gasförmige Ionen überführt (GEY, 2008). Die in den Analysator transferierten Ionen werden im Feld eines Elektromagneten nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und detektiert (HESSE et al., 2012). Zur Vermeidung von Kollisionen zwischen den ionisierten Teilchen wird durch Pumpen ein Hochvakuum im Massenspektrometer erzeugt (GEY, 2008).

4.5.1. Ionenquelle

Die klassische Methode zur Ionisierung ist die Elektronenstoss-Ionisation. Die Ionisierung erfolgt mit energiereichen Elektronen, die mit einer Glühkatode erzeugt werden. Ebenfalls verbreitet ist die chemische Ionisation, bei der ein ionisiertes chemisches Reagens mittels Ladungs- oder Protonenübertragung die zu analysierenden Moleküle ionisiert (ZIMMERMANN und STREIBEL, 2006). Weitere Ionisationsmethoden für schwer verdampfbare Moleküle und Makromoleküle sind der Beschuss mit Atomen (Fast-Atom-Bombardement), die Ionisierung mit Photonen (Laser-Desorption/-Ionisation), die Ionisierung der gelösten Probe in einem elektrischen Feld (Elektronenspray-Ionisation [ESI]) und die Ionisierung aus der festen Phase mittels Matrix assistierter Laser-Desorption/-Ionisation (MALDI) (REICHENBÄCHER und POPP, 2007).

4.5.2. Analysatoren

Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer (MS): Nach erfolgter Ionisierung werden die Moleküle mit Hilfe von Beschleunigungsplatten durch Umwandlung der potentiellen Energie in kinetische Energie auf hohe Geschwindigkeiten gebracht. Die beschleunigten Ionen gelangen in das Magnetfeld, in dem sie durch die Lorenzkraft auf eine Kreisbahn gelenkt werden (GEY, 2008).

Flugzeit-MS (Time of Flight [TOF]-MS): Bei diesem MS werden die Flugzeiten von unterschiedlich schweren Ionen für ihre Trennung ausgenutzt: Leichte Ionen fliegen schneller und erreichen den Massendetektor zuerst (GEY, 2008).

Quadrupol-MS: Bei diesem Analysator-Typ sind vier Magnetstäbe gegenüberliegend angeordnet. Zwei sind mit negativem und zwei mit positivem Spannungspotential belegt. Zudem wird eine Hochfrequenz-Wechselspannung im Winkel von 180° zu den Stäben angelegt. In der Mitte der Magnetanordnung fließt der Ionenstrom, der durch Änderung von Spannung und Frequenz gesteuert wird. Beide werden so gewählt, dass Ionen mit gleicher Masse auf einer entsprechenden Bahn zum Detektor gelangen (GEY, 2008).

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Tiere

Es wurden 12 Kühe der Holstein-Friesian-Rasse untersucht. Die in die Studie eingeschlossenen Tiere waren zu Beginn der Probenentnahme zwischen 3 und 12 Jahre alt (Medianwert 4 Jahre), befanden sich vor der 2. bis 10. Laktation (Medianwert 3. Laktation) und stammten alle aus dem gleichen Landwirtschaftsbetrieb, der von der Abteilung Ambulanz und Bestandesmedizin des Departements für Nutztiere, Vetsuisse-Fakultät Zürich, betreut wird. Um Tiere zu untersuchen, die sich bezüglich Faktoren wie Rasse, Fütterung, Haltung und Management nicht wesentlich unterscheiden, wurden alle Kühe aus dem gleichen Landwirtschaftsbetrieb rekrutiert. Bei allen Kühen war der Besamungszeitpunkt bekannt und sie wurden mittels rektaler Ultraschalluntersuchung auf eine intakte Trächtigkeit überprüft. Zudem mussten sie sich mindestens zwei Wochen vor dem geplanten Geburtstermin befinden, pluripar und zu Beginn der Probenentnahme klinisch gesund sein. Dies wurde mithilfe des Allgemeinzustands, der Befragung des Besitzers und den Daten der Bestandesbetreuung überprüft.

5.1.1. Management und Haltung der Tiere

Die Kühe wurden in einem grösseren Laufstall mit Spaltenboden in einer Herde von 75 Milchkühen gehalten. Es standen ihnen mit einer Kalk-Stroh-Matratze eingestreute Liegeboxen und ein Laufhof zur Verfügung. Die Kühe wurden während der Laktation zwei Mal täglich (zwischen 5.30 und 6.30 Uhr und zwischen 16.45 und 17.45 Uhr) in einem Fischgrätenmelkstand mit 2 x 5 Plätzen gemolken. Das Futter der Tiere bestand während der Galtzeit aus Grassilage, Stroh, wenig Heu und Mineralstoffen. Ca. 2 Wochen vor der geplanten Geburt wurden die Kühe zur Vorbereitung auf die bevorstehende Laktationsration mit der Futtermischung der laktierenden Kühe angefüttert und von der Gruppe der Galtkühe in die Gruppe der laktierenden Kühe verstellt. Zusätzlich erhielten sie in den zwei Wochen vor der

Geburt jeden Tag etwas mehr Kraftfutter über einen Automaten (von 0 bis ca. 1.5 kg). Während der Frühlaktation bestand die Fütterung aus Grassilage, Maissilage, Zuckerrübenschnitzeln, Heu, Soja, Gras und Mineralstoffen sowie 2.5 – 4.0 kg Kraftfutter.

5.2. Entnahme von Blutproben und Leberbiopsien

Für die geplanten Untersuchungen wurden den Kühen Blutproben und Leberbiopsien entnommen. Die Blutprobenentnahmen waren für 14 und 7 Tage vor der erwarteten Geburt, am Tag der Geburt und 7, 14, 21 und 28 Tage danach geplant. Jedoch gab es aus praktischen Gründen teilweise leichte Abweichungen bezüglich des geplanten Entnahmezeitpunkts. Die erste Blutprobe wurde 9 bis 15 Tage (Medianwert 12 Tage) vor dem berechneten Kalbetermin entnommen (Probe -14), die zweite Probe 2 bis 8 Tage (Medianwert 5 Tage) ante partum (Probe -7). Eine dritte Blutprobe wurde innert zwei Tagen nach der Geburt gewonnen (Medianwert 0.5 Tage; Probe 0). Danach folgten vier weitere Blutproben an den Tagen 6 bis 10 (Medianwert 7.5 Tage; Probe 7), 13 bis 17 (Medianwert 14.5 Tage; Probe 14), 20 bis 24 (Medianwert 21.5 Tage; Probe 21) und 28 bis 31 (Medianwert 28.5; Probe 28) post partum. Am Tag der letzten Blutentnahme wurde zusätzlich eine Leberbiopsie entnommen.

Bei 5 Kühen wurde weiterhin wochenweise eine Blutprobe entnommen, da sich die Geburt verzögert hatte. So waren am Ende von jeder Kuh mindestens sieben Blutproben und eine Leberbiopsie vorhanden. Für die Auswertung wurden nur diejenigen Proben berücksichtigt, die nicht mehr als 15 Tage vor der Geburt gewonnen wurden.

5.2.1. Weitere Erhebungen

Zusätzlich zu den Blutproben (Bestimmung des Lipidoms/Metaboloms und der BHB- sowie NEFA-Werte) und den Leberbiopsien (histologische Bestimmung des

Fettgehalts in der Leber) wurde bei jeder Probenentnahme der BCS der Kuh auf einer Skala von 1 (kachektisch) bis 5 (fett) in Viertelpunkte-Abstufungen nach EDMONSON et al. (1989) bestimmt. Diese Einteilung wurde immer von der Doktorandin vorgenommen.

Im Weiteren wurden die Dauer der Galtphase, die Milchleistung in Relation zu den anderen Kühen sowie die Anzahl Tage, die die Geburt, bezogen auf den berechneten Geburtstermin, zu früh bzw. zu spät eintrat, von jeder Kuh erhoben. Es wurde festgehalten, wenn eine Kuh während der Untersuchungsperiode erkrankte, sich verletzte oder medikamentös behandelt wurde.

5.3. Probengewinnung

5.3.1. Blutproben

Für die Gewinnung des Blutplasmas wurden pro Probe 10 ml Vollblut mit einer Kanüle (18G, Terumo Medical Corporation, Somerset, NJ, USA) aus einer der beiden Jugularvenen entnommen und in ein Lithium-Heparin-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verbracht. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, möglichst alle Blutproben zur gleichen Tageszeit zu entnehmen. Die Probengewinnung erfolgte bis auf wenige Ausnahmen nachmittags zwischen 14 und 16 Uhr.

Während des Transports ins Labor wurde das Vollblut bei Umgebungstemperatur aufbewahrt. Spätestens zwei Stunden nach der Entnahme wurde es 10 Min. bei 4000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschliessend wurde das Plasma in Mikroschraubröhrchen à 2 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Für jede Plasmaprobe wurde eine neue Pipette verwendet. Das separierte Plasma wurde danach bis zur Weiterverwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Gefrierdauer bis zur Weiterverarbeitung variierte von wenigen Wochen bis mehreren Monaten.

5.3.2. Leberbioptate

Die Gewinnung der Leberbioptate erfolgte nach MOLGAARD et al. (2012) unter Zuhilfenahme eines portablen Ultraschallgeräts. Mit diesem wurde vor der Entnahme einer Biopsie die geeignetste Biopsiestelle an der rechten Bauchwand eruiert. Danach wurde die Haut an der späteren Entnahmestelle geschoren (ein Feld von ca. 5 x 5 cm), gründlich gereinigt (Betadine-Seife, Provet AG, Lyssach, Schweiz) und desinfiziert (Alkohol und Betadine-Lösung, Provet AG, Lyssach, Schweiz). Zudem wurde eine lokale Infiltrationsanästhesie mit 5 ml Lidocain Hydrochlorid 2 % (Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) durchgeführt und danach wurde erneut desinfiziert. Als nächstes wurde eine Stichinzision in die Haut mit einer Skalpellklinge Nr. 11 (Swann-Morton Ltd., Sheffield, England) durchgeführt. Die Biopsie erfolgte mit einer sterilen Biopsienadel (Bard® Magnum® Core Tissue Biopsy Needle, 14 g x 16 cm, C. R. Bard, Inc., Covington, Georgia, USA). Nach der Entnahme der Leberbiopsie wurde die Einstichstelle mit ein bis zwei Hautklammern (Covidien Appose ULC 35 W, medical solution GmbH, Hünenberg, Schweiz) verschlossen und ein letztes Mal mit Betadine-Lösung desinfiziert. Das Biopat wurde sofort nach der Entnahme in eine gepufferte 4 %-ige Formalinlösung (Formafix AG, Hittnau, Schweiz) verbracht und zur Untersuchung ins Labor des Instituts für Veterinärpathologie der Universität Zürich eingeschickt.

5.4. Histologie Leberbioptate

Die Leberbioptate wurden nach der Entnahme zwecks Fixierung mehrere Stunden in der Formalinlösung belassen, danach entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet. Als nächstes wurde das Lebergewebe mit einem Mikrotom in Dünnschnitte zerteilt und routinemässig mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Alle Bioptate wurden von der gleichen Person, einer Board zertifizierten Pathologin (Dipl. ECVP), bearbeitet und danach in verschiedene, zuvor festgelegte Gruppen mit unterschiedlichen Verfettungsgraden eingeteilt:

- Gruppe 0: Keine Leberverfettung (keine Fetteinlagerung in den Hepatozyten)
- Gruppe 1: Leichtgradige Leberverfettung (nur eine Zone / ein Abschnitt der Hepatozyten betroffen; z. B. zentrolobulär / periportal / midzonär)
- Gruppe 2: Mittelgradige Leberverfettung (zwei Zonen betroffen; z.B. zentrolobulär bis midzonär)
- Gruppe 3: Hochgradige Leberverfettung (alle drei Zonen betroffen; evtl. inklusive Kupffer'schen Sternzellen).

5.5. Lipidomik

Für die Erhebung des Lipidoms der beprobten Kühe wurde in einem ersten Schritt eine Lipidextraktion durchgeführt. Danach wurden die extrahierten Lipide mittels einer Flüssigchromatographie aufgetrennt und mit Hilfe eines Massenspektrometers analysiert. Anschliessend wurden die akquirierten Daten am Computer mittels einer speziellen Software (mzMine) bearbeitet und die Metaboliten wurden mit Hilfe einer Datenbank (Lipidmaps) identifiziert. Als letzter Schritt erfolgte eine statistische Auswertung.

5.5.1. Lipidextraktion

Um für die Lipidomuntersuchungen reine Lipide, ohne Verunreinigung mit anderen Stoffen, zu erhalten, die natürlicherweise im Plasma vorkommen, wurde eine Lipidextraktion durchgeführt. Diese erfolgte mit der Methode nach MATYASH und LIEBISCH (2008) mit *tert*-Butylmethylläther (MTBE). Die Lipidextraktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die Lipide zu extrahieren, wurden pro vorhandene Plasmaprobe 127.5 µl Methanol und 23 µl einer 10 µM-Lösung eines internen Standards (IS) in ein vorbereitetes und beschriftetes Eppendorfröhrchen gegeben. Der IS bestand dabei aus einem Gemisch aus sechs verschiedenen Lipiden

(Tab. 1) und seine Endkonzentration wurde so berechnet, dass die organische Phase 350 nM der einzelnen Lipide enthielt.

Tab. 1: Für den internen Standard verwendete Lipide

Lipid	CAS-Nr.	Produkt-Nr.	Masse (u)
Phosphatidylcholin 13:0	71242-28-9	850340 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)	649.468
Phosphatidylcholin 23:0	112241-60-8	850372 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)	929.781
Lyso-Phosphatidylcholin 17:0	50930-23-9	855676 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)	509.348
Lyso-Phosphatidylcholin 19:0	108273-88-7	855776 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)	537.379
vierfach methyliertes Phosphatidylcholin 16:0	32448-32-1	850356 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)	845.687
Palmitinsäure C13	57677-53-9	CLM-150-1 (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA)	257.240

Danach wurden 20 µl von jeder Plasmaprobe zu je einem Röhrchen mit Methanol und IS gegeben und jedes Eppendorfröhrchen wurde mit einem Schüttelgerät (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. Als nächster Schritt erfolgte eine Zugabe von 500 µl MTBE pro Probe. Dieses Gemisch wurde im Thermomixer Comfort (Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, Schweiz) eine Stunde lang bei Raumtemperatur (22 °C) und mit 800 rpm geschüttelt. Danach wurden zu jeder Probe 125 µl Wasser (HPLC-klassifiziert, doppelt destilliert) gegeben, jedes Röhrchen erneut mit dem Vortex gemischt und alle Proben bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine klare Trennung zwischen der lipidhaltigen (oberen) und der nicht-lipidhaltigen (unteren)

Phase erkennbar, sodass 300 µl der oberen Phase abpipettiert und in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert werden konnten. Diese Röhrchen wurden während 10 Min. in einer Vakuumzentrifuge (Savant Speed Vac® Plus SC110A, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA) zentrifugiert, sodass das MTBE verdampfen konnte. Als letzter Schritt wurde der Rückstand mit jeweils 300 µl Methanol gelöst.

5.5.2. Lipiddetektion und Lipidanalyse

Zur Lipiddetektion und -analyse wurde eine Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UPLC) durchgeführt, die mit einem Massenspektrometer (Quadrupol-TOF Massenspektrometer, Synapt G2 HDMS, Waters, Milford, MA, USA) gekoppelt wurde. Dies geschah nach CASTRO-PEREZ et al. (2010).

Für die Chromatographie und als Einlass für das MS wurde der Acquity™ UPLC (Waters, Milford, MA, USA) verwendet. Die extrahierten Plasmaproben wurden in eine HSS T3, 1.8 µm C₁₈-Säule mit einer Grösse von 2.1 x 100 mm (Waters, Milford, MA, USA) injiziert, die im Säulenofen auf 55 °C erwärmt wurde. Der durchschnittliche Säulendruck betrug ca. 7'000 psi (max. 8'000 psi). Es wurden nur Messungen im Positiv-ESI-Modus ausgewertet.

Alle Proben wurden im gleichen Durchlauf gemessen, um die Resultate später miteinander vergleichen zu können. Die Genauigkeit der durchgeführten Messungen der UPLC wurde mittels interner Standards (IS) überprüft. Dazu wurde eine 10 µM-Mischung der für interne Standards verwendeten Lipide (Tab. 1) verwendet und es wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (350, 500 und 700 µM). Ein passender interner Standard diente dazu, die Extraktion, die Injektion, die Ionisationsvariabilität und die Identifikation der Substanzen zu prüfen (LIU et al., 2012).

Die Massengenauigkeit des Spektrometers wurde durch einen integrierten Standard, die Referenzmasse, sichergestellt. Dafür wurde Leucinenkephalin mit der Masse

m/z 556.2771 benutzt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden alle Proben mehrmals gemessen.

Für die UPLC wurde ein Gradientensystem, bestehend aus zwei Lösungsmitteln, angewendet: Lösungsmittel 1 bestand dabei aus Acetonitril und Wasser (60:40) mit 10mM Ammoniumazetat und Lösungsmittel 2 aus Acetonitril und Isopropanol (10:90) mit 10 mM Ammoniumazetat.

Zum Aufziehen der Probe wurden als Injektionslösemittel das Lösungsmittel 1 und zur Reinigung der Injektionsnadel Isopropanol 100 % benutzt.

Die Probenanalyse wurde mit einem linearen Gradienten über 15 Minuten durchgeführt. Die Konzentration des Lösungsmittels 1 betrug zu Beginn 60 %, sank nach 10 Minuten auf 0 % ab, um nach 12 Minuten bis zum Ende der Laufzeit wieder auf dem Ausgangswert zu sein (Tab. 2). Der Fluss betrug während der gesamten Laufdauer 0.4 ml/Min. und das Injektionsvolumen 10 µl. Während der gesamten Messdauer wurden Massen im Bereich von 50 bis 1200 Da mit einer Messzeit von 0.3 s erfasst.

Tab. 2: Gradienten der Extraktionslösungen und Flussgeschwindigkeit

Zeit (Min.)	Fluss (ml/Min.)	% Lösungsmittel 1	% Lösungsmittel 2
0	0.4	60	40
10	0.4	0	100
11.99	0.4	0	100
12	0.4	60	40
15	0.4	60	40

5.5.3. Metabolomik

Um weitere Auffälligkeiten im Plasma von an FLS erkrankten Kühen erkennen zu können, wurde zusätzlich eine Metabolomik-Messung im Positiv-ESI-Modus durchgeführt, womit zusätzlich zu den Lipiden auch weitere Metaboliten gemessen

werden konnten. Dazu wurden dieselben Proben verwendet, die für die Lipidomik bereits extrahiert wurden. Dieses Mal wurde die untere Phase (mit Methanol und Wasser) der durch MTBE aufgetrennten Probe abpipettiert und vor der Messung für einen Tag bei -20 °C in einem Eppendorfröhrchen aufbewahrt. Für die nachfolgende UPLC wurden nun folgende Lösungsmittel verwendet: Lösungsmittel 1 bestand aus Wasser und Ameisensäure (0.1%) und Lösungsmittel 2 aus Acetonitril und Ameisensäure (0.1%). Als Injektionslösungsmittel diente Acetonitril mit Wasser (60:40) und zur Reinigung der Injektionsnadel ebenfalls Acetonitril mit Wasser (80:20). Die Probenanalyse wurde erneut über 15 Minuten durchgeführt. Die Konzentration des Lösungsmittels 1 betrug zu Beginn 90 %, sank nach 10 Minuten auf 0 % ab, um nach 12 Minuten bis zum Ende der Laufzeit wieder auf dem Ausgangswert zu sein. Der Fluss betrug erneut 0.4 ml/min. und das Injektionsvolumen 10 µl. Es wurden Massen im Bereich von 50 bis 1200 Da mit einer Messzeit von 0.3 s erfasst. Auch bei der Metabolomik wurden nur Messungen im Positiv-ESI-Modus ausgewertet, da die Messungen im Negativ-ESI-Modus keine interpretierbaren Daten lieferten.

5.5.4. Verarbeitung der Rohdaten und Metabolitenidentifikation

Die aufgezeichneten massenspektrometrischen Daten wurden mit dem Programm MZmine bearbeitet und für die statistische Auswertung mit dem Programm R (<http://www.r-project.org/>; <http://stat.ethz.ch/CRAN/>; Projekt GNU der Free Software Foundation, Boston, USA) vorbereitet.

Um den molekularen Massen eine mögliche chemische Identität zuweisen zu können, wurde die Datenbank-Suche von MZmine verwendet (Datenbank „Lipidmaps“, www.lipidmaps.org, University of California, La Jolla, CA, USA)

5.6. Messung von NEFA und BHB

Zusätzlich zum Lipidom wurden auch die peripartalen NEFA- und BHB-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden dieselben Blutproben wie für die Lipidomuntersuchungen verwendet, jedoch ohne Lipidextraktion und Zugabe des internen Standards. Diese unterliefen einen einmaligen Gefrierzyklus bei -80 °C. Dort wurden sie zwischen 2 Wochen und 5 Monaten aufbewahrt. Zur Weiterverarbeitung wurden die Plasmaproben schonend bei Raumtemperatur und kurz in einem lauwarmen Wasserbad aufgetaut und danach mit dem Schüttelgerät (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gut gemischt. Die BHB-Messungen wurden sofort nach dem Auftauprozess bei Raumtemperatur durchgeführt und die NEFA-Messungen nach 24 Stunden, wobei sie bis dahin bei 4 °C aufbewahrt wurden.

Pro Plasmaprobe wurden ca. 400 µl mit je einer frischen Plastikpipette abpipettiert und in ein für das Messgerät geeignetes Gefäss verbracht. Danach wurden die Proben in den Cobas Mira S Chemistry Analyzer (Roche, Schweiz) gegeben, der die Messungen automatisch durchführte, nachdem er zuvor kalibriert wurde.

5.6.1. NEFA

Die NEFA-Konzentrationen wurden mittels eines enzymatischen Farbtests zur quantitativen in-vitro-Diagnostik (Wako NEFA-HR[2], Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland) gemessen. Dazu wurden zwei Gebrauchslösungen hergestellt: Für jedes Reagens (R1 und R2) musste ein geliefertes Farbreagens mit einer Lösung gemischt werden. Danach wurden 7 µl der zu testenden Plasmaprobe mit 300 µl von Reagens 1 zusammengemischt. Nach 3 Minuten wurden 150 µl von Reagens 2 dazu gegeben und das Ergebnis nach 7.5 Minuten auf einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die NEFA-Konzentrationen wurden dann anhand einer Kalibrationskurve bestimmt und in mEq/l ausgedruckt (dabei gilt 1 mEq/l = 1 mmol/l). Von

jedem Versuchstier wurden, entsprechend der Zeitpunkte, sieben NEFA-Messungen durchgeführt.

5.6.2. BHB

Für die Messung der BHB-Konzentrationen wurde nach dem β -Hydroxybutyrate LiquiColor® Procedure No. 2440 (Stanbio Laboratory, Texas, USA), vorgegangen, welches ebenfalls automatisch vom Cobas Mira S Chemistry Analyzer (Roche, Schweiz) durchgeführt wurde: Reagens 1, welches BHB-Dehydrogenase und Diaphorase Enzyme enthält (Stanbio Laboratory, Boerne, Texas), wurde für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieses Reagens wurde danach in zwei Röhrchen verbracht (2.15 ml pro Röhrchen).

In das erste Röhrchen wurden zum Reagens 1 zusätzlich 60 μ l einer Plasmaprobe hinzugefügt. Danach wurde von diesem Gemisch sofort die optische Dichte bei 505 nm gemessen (a). Als nächstes wurden als dritte Substanz 0.36 ml des Reagens 2 mit Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid und Oxalat (Stanbio Laboratory, Texas, USA) in das erste Röhrchen gegeben und erneut, nach 5 Min. Wartezeit, die optische Dichte bei 505 nm bestimmt (b).

In das zweite Röhrchen wurden zum Reagens 1 zusätzlich 60 μ l eines Hydroxybutyrat-Standards (Stanbio Laboratory, Boerne, Texas) gegeben und es wurde ebenfalls sofort die optische Dichte gemessen (c). Danach wurde auch diesem Röhrchen dieselbe Menge des Reagens 2 beigegeben und - nach 5 Min. - ein letztes Mal die optische Dichte gemessen (d).

Als letzter Schritt wurden bei jedem Röhrchen die erste optische Dichte (a bzw. c) von der zweiten optischen Dichte (b bzw. d) subtrahiert (Ergebnis = optische Dichte (5 Min.) Plasma bzw. optische Dichte (5 Min.) Standard). Die Menge des BHB (in mmol) wurde dann nach folgender Formel automatisch berechnet:

$$\text{BHB (mmol)} = \frac{\text{Optische Dichte (5 min.) Plasma} \times 1 \text{ mM} \times \text{Verdünnung Plasma}}{\text{Optische Dichte (5 min.) Standard}}$$

Von jeder Kuh wurden 7 BHB-Messungen durchgeführt. Die BHB-Resultate werden nachfolgend in $\mu\text{mol/l}$ angegeben.

5.7. Statistische Auswertung

Die Berechnungen der Mittel- und Medianwerte sowie der Standardabweichungen und die Prüfung auf Signifikanz zwischen den Gruppen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms IBM® SPSS® Statistics 21 und des Programms GraphPad Prism® 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA). Bei normalverteilten Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben, bei nicht normalverteilten Daten der Medianwert. Der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilkinson-Test wurden zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung herangezogen. Bei den statistischen Untersuchungen wurden nicht-parametrische Tests angewendet. P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant definiert.

Zur anschaulichen Darstellung der Werte in Diagrammen wurde das Programm GraphPad Prism® 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Für die Auswertung der Lipidomik-Daten wurde eine Gruppenanalyse durchgeführt. Die Gruppenanalyse ist ein Verfahren der multivariaten Statistik („between group analysis“, BGA), die dazu dient, umfangreiche Datensätze zu strukturieren, indem eine Vielzahl statistischer Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen ersetzt wird (DUNTEMAN, 1989). Sie berechnet diejenigen Komponenten, die die grösste Proportion von Varianzen in einem Datenset erklären (EJSING et al., 2012). Somit können mehrere Dimensionen in zwei Dimensionen projiziert werden. Die Achsen spannen die Hauptkomponenten auf. Der Wert gibt die Eigenvektoren der zwei Hauptkomponenten an.

Horizontal zeigt sich die erste Komponente, die am stärksten für die Auftrennung zuständig ist. Vertikal zeigt sich die zweitstärkste Komponente. Die Einheit der Werte ist die Varianz. Der Wert d beschreibt die Dimension der Varianz. Grundsätzlich gilt: je grösser die Distanz zwischen zwei Lipidomen auf der Grafik ist, desto unterschiedlicher sind die jeweiligen Lipidome. Für die Distanz zwischen zwei Lipidomen verantwortlich sind signifikant unterschiedliche Massen. Diese Massen sollen in diesem Projekt eruiert werden.

Für die Berechnung des prozentualen Anstiegs zwischen zwei nachfolgenden Werten der NEFA- und BHB-Messung wurde die folgende Formel nach GÄRTNER und GASCHA (2008) verwendet:
$$\frac{\text{Endwert (W)} * 100}{\text{Grundwert (G)}}$$

Dabei entspricht der Endwert dem nachfolgenden Wert und der Grundwert dem vorangegangenen Wert.

5.8. Zusammenarbeit mit anderen Instituten und Abteilungen der Universität Zürich

Die Arbeit wurde von Dr. C. Gerspach geleitet. Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren neben dem Departement für Nutztiere der Universität Zürich (Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun) die folgenden Institutionen beteiligt:

- Abteilung für Veterinärtoxikologie der Universität Zürich (Prof. Dr. H. Nägeli): Zusammenarbeit mit PhD Student Sandro Imhasly zur Lipidomuntersuchung der Plasmaproben und deren Auswertung
- Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich (Prof. Dr. A. Pospischil): Histologische Untersuchung der Leberbiopsien durch Frau Dr. med. vet. Dipl. ECVP Maja Rütten
- Abteilung für Ambulanz und Bestandesmedizin des Departements für Nutztiere (Prof. Dr. M. Hässig): Tierärztliche Betreuung des Herkunftsbetriebs der Kühe

- Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften, ETH Zürich (Prof. Dr. L. Nyström): Bereitstellung von Geräten für die UPLC und die Massenspektrometrie.

5.9. Tierversuchsbewilligung

Für die Untersuchungen lag eine Tierversuchsbewilligung (27-2013) des kantonalen Veterinäramts Zürich vor.

6. ERGEBNISSE

6.1. Versuchstiere

Die Galtzeit der Kühe betrug 44 bis 84 Tage (Medianwert 60 Tage). Das Kalbedatum wich von einem bis 10 Tage vom berechneten Geburtstermin ab. Die durchschnittliche Milchleistung der Kühe belief sich in der vorangegangenen Laktation bei allen Tieren auf einen Wert zwischen 8'000 und 10'000 kg.

Bei einigen Kühen traten im Verlauf der Untersuchungsperiode die folgenden, von der Ambulanz und Bestandesmedizin diagnostizierten Erkrankungen auf: Gebärpause (klinische Verdachtsdiagnose; $n = 7$), Nachgeburtverhalten mit nachfolgender Metritis ($n = 2$), Mastitis ($n = 1$) und diverse Lahmheiten ($n = 4$), die teilweise medikamentös behandelt werden mussten (Anhang 1). Bei den Proben, die während der Absetzfristen von Medikamenten entnommen wurden, handelte es sich um die Proben 0 und 7 (Kuh 6), 14 (Kuh 11) und 7 (Kuh 13).

6.2. Entnahmedaten der Blutproben

Um die Ergebnisse der Lipidomik besser beurteilen zu können, war es nötig, die exakten Daten der Blutentnahmen in Bezug auf den Tag der Geburt zu dokumentieren. Da es nicht möglich war, das genaue Geburtsdatum vorherzusehen und aus praktischen Gründen nicht jeden Tag Blutproben gewonnen werden konnten, weichen die einzelnen Tage der Probenentnahmen zwischen den Versuchstieren leicht ab (Anhang 2). Es gab jedoch keine Überschneidungen zwischen den verschiedenen Probennummern.

6.3. Leberbiopsien

Von den 12 untersuchten Leberbiopsien stellte eine Probe eine normale Leber dar. Sieben Proben zeigten eine leichtgradige Leberverfettung, 4 eine mittelgradige und keine Probe eine hochgradige Verfettung (Abb. 1; Tab. 3).

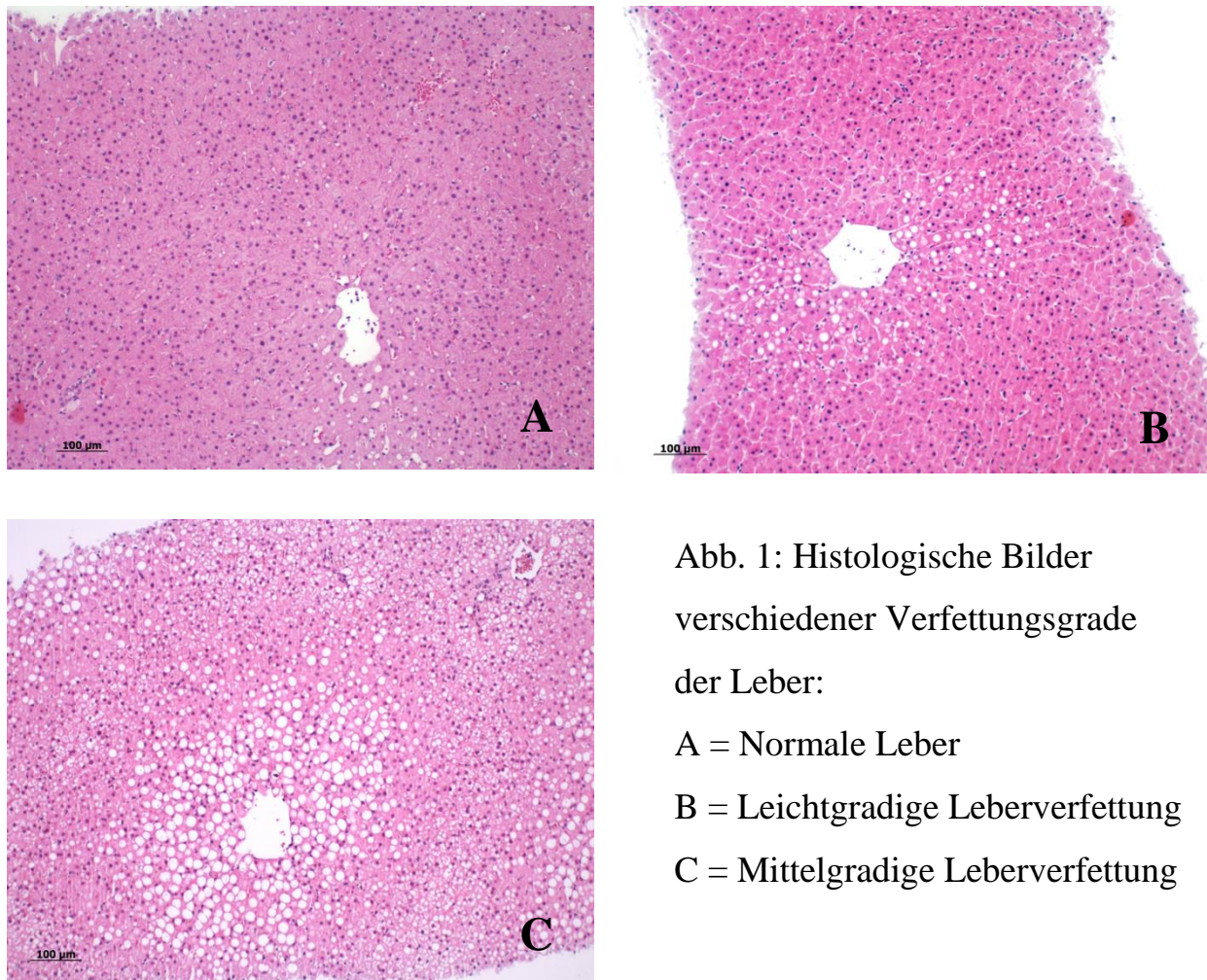


Abb. 1: Histologische Bilder verschiedener Verfettungsgrade der Leber:

A = Normale Leber

B = Leichtgradige Leberverfettung

C = Mittelgradige Leberverfettung

Tab. 3: Übersicht über die histologischen Diagnosen

Histologische Diagnose Leberbiopsie	Anzahl Tiere (n)
Keine Leberverfettung (Schweregrad 0)	1
Leichtgradige Leberverfettung (Schweregrad 1)	7
Mittelgradige Leberverfettung (Schweregrad 2)	4
Hochgradige Leberverfettung (Schweregrad 3)	0

6.4. BCS

Die BCS-Werte der Kühe unterschieden sich teilweise erheblich (Anhang 3). Da es sich jedoch um einzelne Bestimmungen handelte, konnten keine Signifikanzen bestimmt werden. Bei der ersten BCS-Bestimmung am Tag -14 variierten die BCS-Werte zwischen 3 und 4.5. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den nächsten zwei Zeitpunkten bis kurz nach der Geburt. Bei den Bestimmungen nach der Geburt divergierten die Tiefst- und Höchstwerte immer mehr, beispielsweise am Tag 28 post partum, an welchem die BCS-Werte zwischen 1.25 und 4 lagen.

Bei einigen Tieren waren grosse Schwankungen im Verlauf der BCS-Werte feststellbar. Am Tag 7 post partum sank der BCS bei den meisten Kühen im Vergleich zu den präpartalen Werten leicht auf Werte zwischen 2.75 und 4.25 ab. Am Tag 28 war dies noch stärker ausgeprägt. An diesem Tag wurden bei 9 Tieren die tiefsten BCS-Werte ermittelt (Anhang 3). Insgesamt wiesen 3 Tiere einen postpartalen Rückgang des BCS von einem Punkt oder mehr auf.

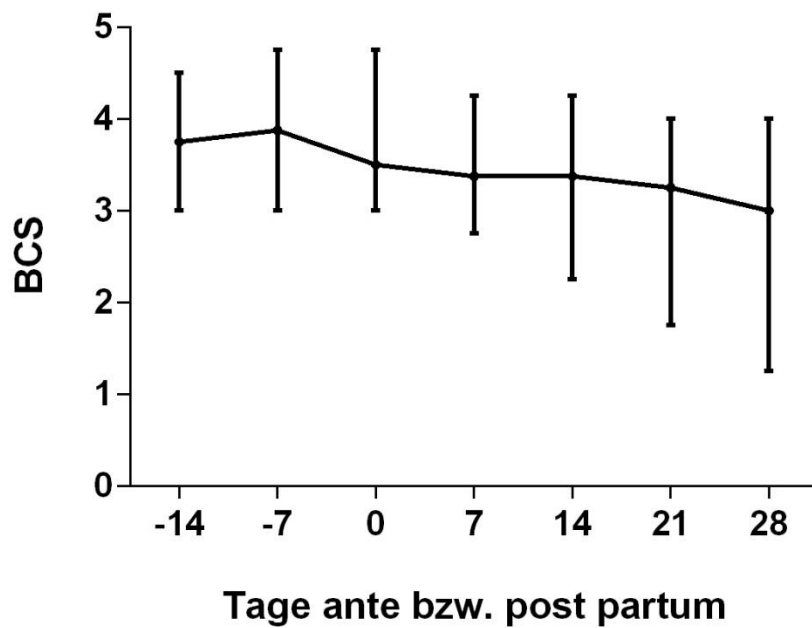


Abb. 2: Verlauf des BCS aller Tiere über die gesamte Versuchsdauer (Median mit Minimal- und Maximalwerten).

6.5. NEFA- und BHB-Bestimmungen

6.5.1. Nicht-veresterte Fettsäuren-Konzentrationen

Die niedrigsten NEFA-Werte (Abb. 3) wurden zu den Zeitpunkten -7 oder -14 vor der Geburt gemessen. Beim Tier, das den tiefsten Wert nicht vor, sondern nach der Geburt aufwies, geschah dies zum Zeitpunkt +28. Die höchsten Messwerte wurden bei 5 von 12 Tieren zum Zeitpunkt 0, also kurz nach der Geburt, bei 3 zum Zeitpunkt +7 und bei weiteren 4 zu einem späteren Zeitpunkt nach der Geburt gefunden. Die einzelnen NEFA-Werte variierten zwischen 0.16 und 1.00 mmol/l. Ab dem Tag 0 post partum waren die NEFA-Konzentrationen signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Tag 14 ante partum ($P = 0.01$; Wilcoxon-Test). In der Abb. 4 sind der Verlauf der NEFA-Konzentrationen und der Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte mit Tag 14 ante partum ersichtlich.

Kuh	NEFA -14	NEFA -7	NEFA 0	NEFA 7	NEFA 14	NEFA 21	NEFA 28	Median- wert
1	0.28	0.49	0.91	0.90	0.84	0.55	0.71	0.71
2	0.25	0.19	0.93	0.93	0.89	0.86	0.78	0.86
4	0.18	0.28	0.79	0.63	0.36	0.60	0.70	0.60
5	0.20	0.44	0.72	0.54	0.68	0.72	0.51	0.54
6	0.43	0.38	0.51	0.76	0.42	0.40	0.36	0.42
7	0.26	0.19	0.70	1.00	0.48	0.87	0.48	0.48
8	0.16	0.19	0.83	0.87	0.77	0.79	0.58	0.77
9	0.49	0.35	0.65	0.51	0.68	0.81	0.67	0.65
10	0.61	0.58	0.89	0.67	0.72	0.91	0.74	0.72
11	0.17	0.20	0.72	0.77	0.72	0.50	0.91	0.72
13	0.63	0.80	0.93	0.92	0.86	0.81	0.69	0.81
14	0.20	0.29	0.45	0.69	0.74	0.83	0.82	0.69
Median- wert	0.26	0.32	0.75	0.76	0.72	0.80	0.70	

Abb. 3: Verlauf der NEFA-Konzentrationen aller Kühe (mmol/l).

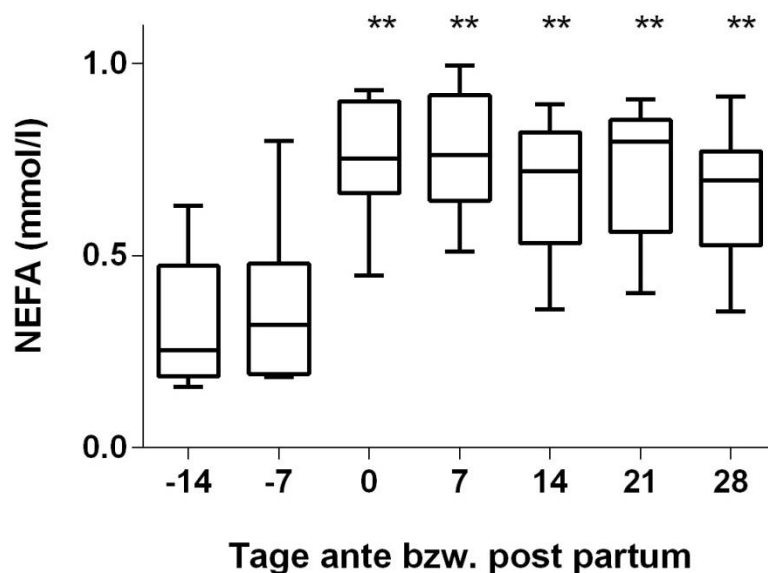


Abb. 4: Verlauf der NEFA-Konzentrationen aller Kühe über die gesamte Versuchsdauer und Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte mit dem Tag 14 ante partum (** = $P < 0.01$).

Wird der Verlauf der NEFA-Konzentrationen in Bezug auf den Leberverfettungsgrad aufgezeichnet, so wird erkennbar, dass das einzige Tier mit normaler Leber im Vergleich zu den anderen Kühen einen späteren Anstieg mit einem kurzen Peak zeigte, und dass die NEFA-Konzentrationen danach wieder auf ein deutlich tieferes Niveau sanken. Die NEFA-Werte der Tiere mit einer Leberverfettung zeigten einen früheren, steileren Anstieg und die Werte blieben bis zum Versuchsende auf hohem Niveau, wobei sie in der Gruppe des mittelgradigen FLS noch höher ausfielen als in der Gruppe des leichtgradigen FLS (Abb. 5).

Es waren also Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen. Diese waren jedoch nur am Tag 14 post partum signifikant (Kap. 6.6).

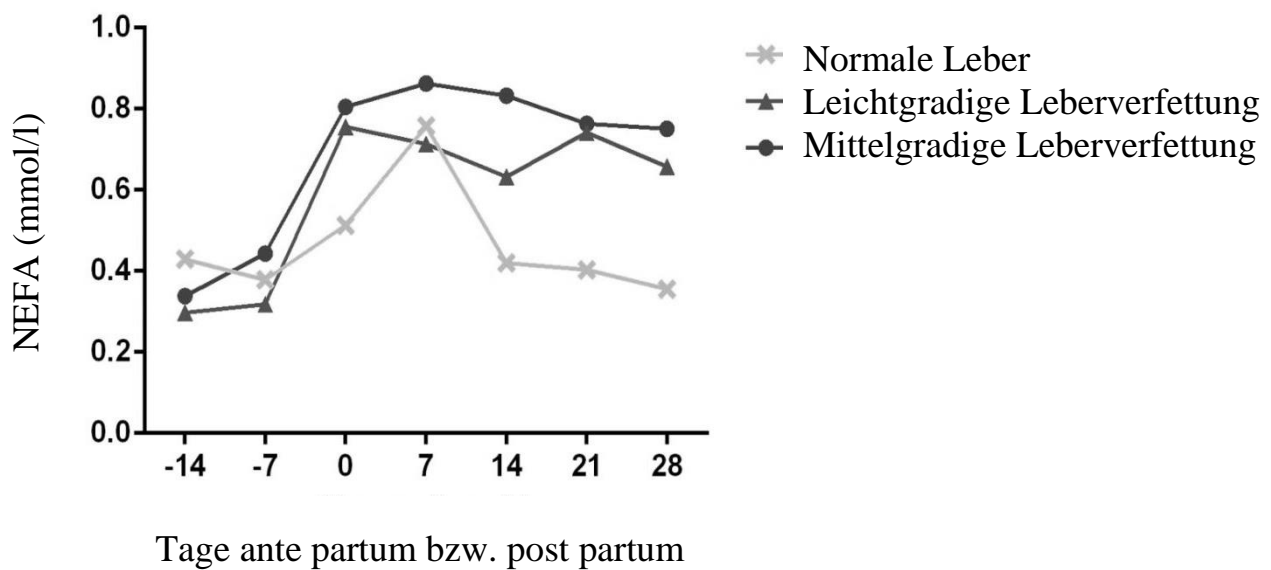


Abb. 5: Verlauf der NEFA-Mittelwerte über den ganzen Versuchszeitraum aufgeteilt nach Schweregrad der Leberverfettung.

6.5.2. β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen

Die Tiefstwerte der BHB-Konzentrationen wurden, bis auf 3 Tiere, vor der Geburt gemessen. Die höchsten Messwerte wurden bei 4 von 12 Tieren zum Zeitpunkt +7, bei 4 zum Zeitpunkt +14 und bei weiteren 4 zu einem späteren Zeitpunkt. Die einzelnen BHB-Werte variierten zwischen 230 und 4413 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 6).

Ab dem Tag 7 post partum waren die BHB-Konzentrationen signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Tag 14 ante partum ($P = 0.01$; Wilcoxon-Test). In Abb. 7 sind der Verlauf der BHB-Konzentrationen und der Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte mit dem Tag 14 ante partum ersichtlich.

Kuh	BHB -14	BHB -7	BHB 0	BHB 7	BHB 14	BHB 21	BHB 28	Median- wert
1	708	602	865	1578	1085	3389	3358	1085
2	537	406	705	1749	2142	1589	2062	1589
4	450	505	692	763	1050	722	550	692
5	737	536	1569	2705	2248	1790	1777	1777
6	387	732	378	958	653	783	724	724
7	410	529	348	539	332	230	251	348
8	704	569	599	736	4313	3418	4065	736
9	420	696	1080	1236	1695	1141	1259	1141
10	340	518	707	467	795	1182	1407	707
11	734	708	335	1222	276	949	555	708
13	1444	1786	3563	2120	3951	4336	4413	3563
14	714	597	818	1525	1878	2222	1350	1350
Median- wert	620	583	706	1229	1390	1386	1379	

Abb. 6: Verlauf der BHB-Konzentrationen aller Kühe ($\mu\text{mol/l}$).

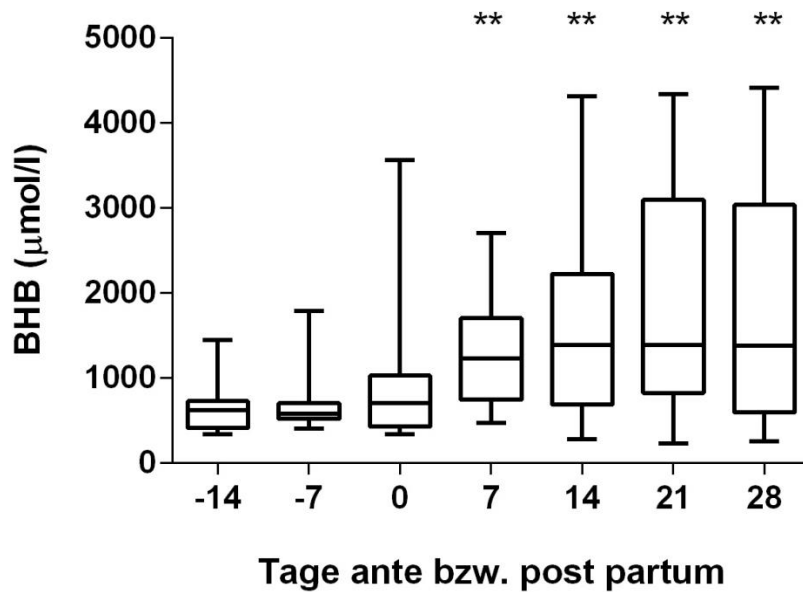


Abb. 7: Verlauf der BHB-Werte aller Kühe über die gesamte Versuchsdauer und Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte mit Tag 14 ante partum (** = $P < 0.01$).

6.5.3. Vergleich der BHB- und NEFA-Konzentrationen

Die NEFA-Werte stiegen im Allgemeinen früher an als die BHB-Werte (Abb. 8) und der prozentuale Anstieg (Anstiegsfaktor) war grösser (Abb. 9). Die NEFA-Werte erreichten bei den meisten Tieren ihren Peak schon zum Zeitpunkt der Geburt, wogegen die BHB-Werte ihren Höchstwert erst ca. zwei Wochen nach der Geburt erreichten.

Der jeweils steilste Anstieg zwischen zwei Messungen (Mittelwert aller 12 Kühe) erfolgte bei BHB zwischen den Proben 0 und +7 (Zunahme um den Faktor 1.70) und bei NEFA zwischen den Proben -7 und 0 (Zunahme um den Faktor 2.54).

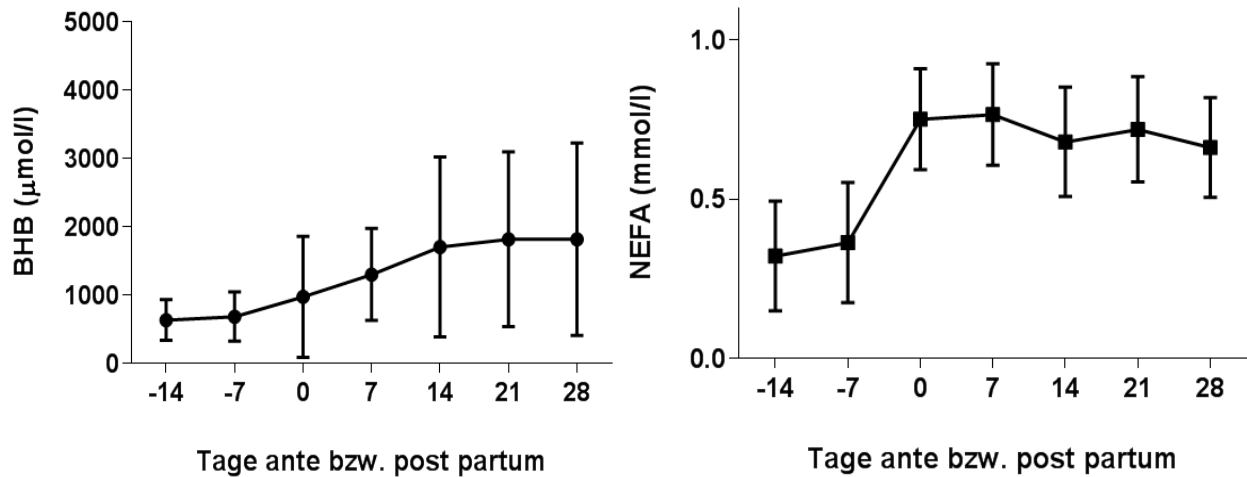


Abb. 8: Mittelwert und Standardabweichung von BHB und NEFA aller Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer.

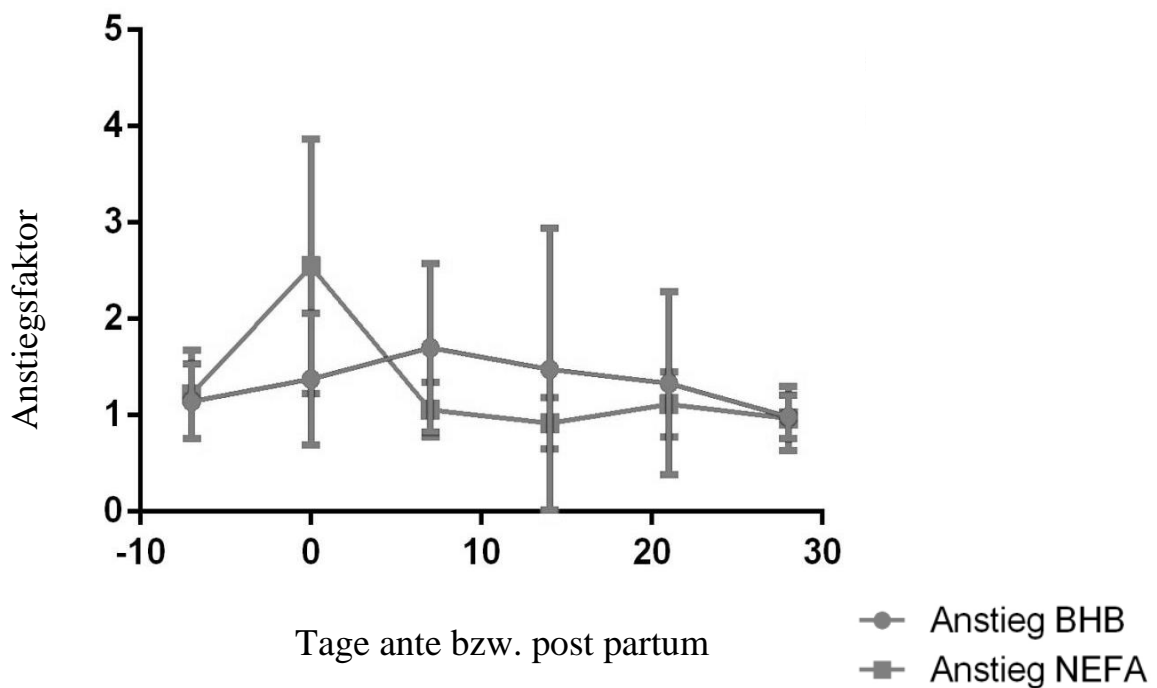


Abb. 9: Mittelwert und Standardabweichung der Anstiegsfaktoren von NEFA und BHB aller Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer.

6.6. Zusammenhang zwischen den NEFA-/BHB-Konzentrationen und dem Leberverfettungsgrad

Beim Vergleich der Verteilung der NEFA-Werte über den gesamten Verlauf zwischen den Schweregraden war mit Ausnahme des Tags 14 keine Beziehung zwischen dem Leberfettgehalt und den NEFA-Konzentrationen festzustellen. Am Tag 14 wiesen Kühe mit leichtgradiger Leberverfettung ($n = 7$) eine NEFA-Konzentration von 0.63 mmol/l auf. Bei den Kühen mit mittelgradiger ($n = 4$) Leberverfettung waren die NEFA-Konzentrationen mit 0.83 ± 0.07 mmol/l signifikant höher ($P = 0.01$; Mann-Whitney-Test) als bei den Kühen mit leichtgradiger Leberverfettung (Abb. 10). Bei den BHB-Konzentrationen waren die Unterschiede zwischen den Schweregraden nicht signifikant.

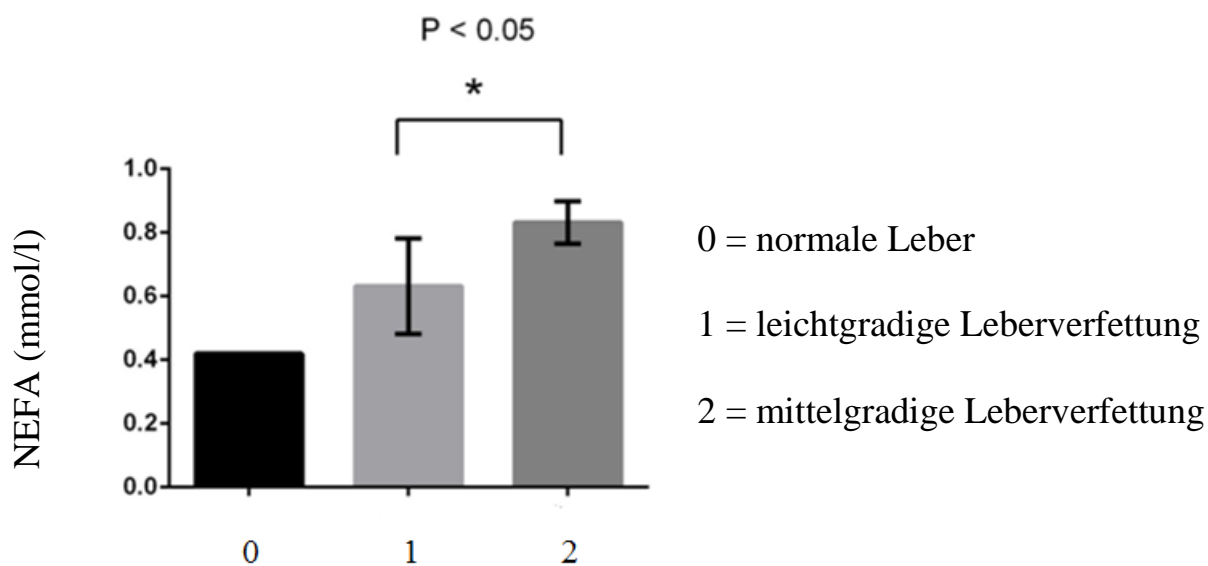


Abb. 10: NEFA-Konzentrationen am Tag +14 bei der Kuh mit normaler Leber und bei den Kühen mit leicht- bzw. mittelgradiger Leberverfettung.

6.7. Ergebnisse der Lipidomik

Für die Interpretation der Gruppenanalysen gelten die Nummerierungen gemäss Tabelle 4. Die Ergebnisse basieren auf Messungen im Positiv-ESI-Modus.

Tab. 4: Übersicht über die histologischen Diagnosen aller in der Lipidomik und Metabolomik gemessenen Tiere

Histologische Diagnose Leberbiopsie	Betroffene Tiere
Keine Leberverfettung (Schweregrad 0)	6
Leichtgradige Leberverfettung (Schweregrad 1)	4, 5, 7, 8, 9, 10, 11
Mittelgradige Leberverfettung (Schweregrad 2)	1, 2, 13, 14

Gruppenanalyse des Lipidoms aller Kühe im Überblick

Die Gruppenanalyse zeigt, dass alle Kühe im Lipidom, unabhängig von ihrer histologischen Diagnose, ungefähre Deckungsgleichheit aufwiesen (Abb. 11).

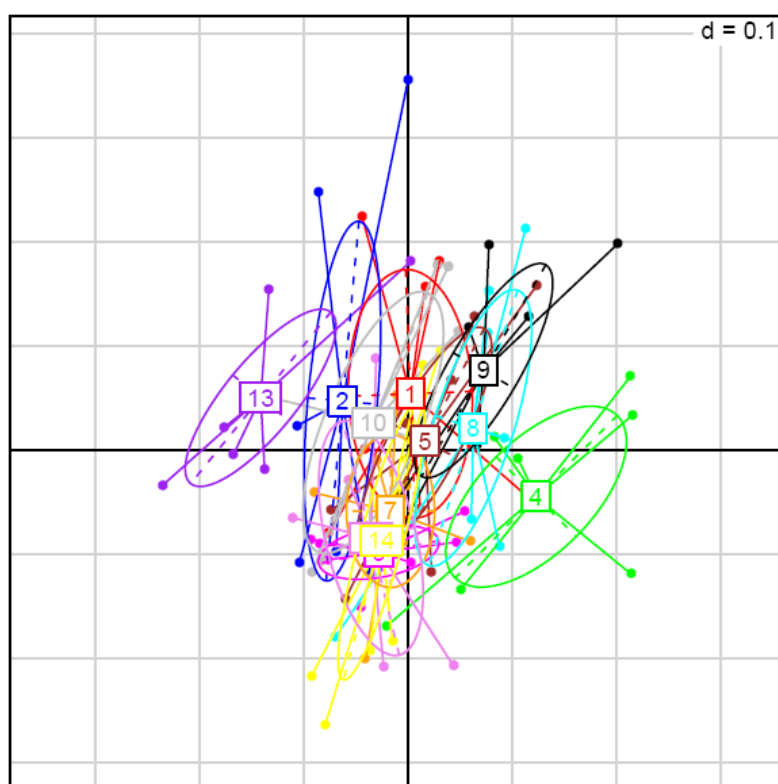


Abb. 11: Gruppenanalyse: Vollständiges Lipidom aller 12 Kühe in der Übersicht (eine Farbe entspricht einer Kuh).

Gruppenanalyse der Lipidome nach peripartalem Zeitpunkt aufgetrennt

Hier zeigte sich, dass die präpartal entnommenen Blutproben deutlich von den postpartal entnommenen abwichen (Abb. 12). Letztere wiesen einen linearen Verlauf mit nur geringer Überschneidung der einzelnen Zeitpunkte auf, während sich die beiden präpartal entnommenen Proben stark überlagerten.

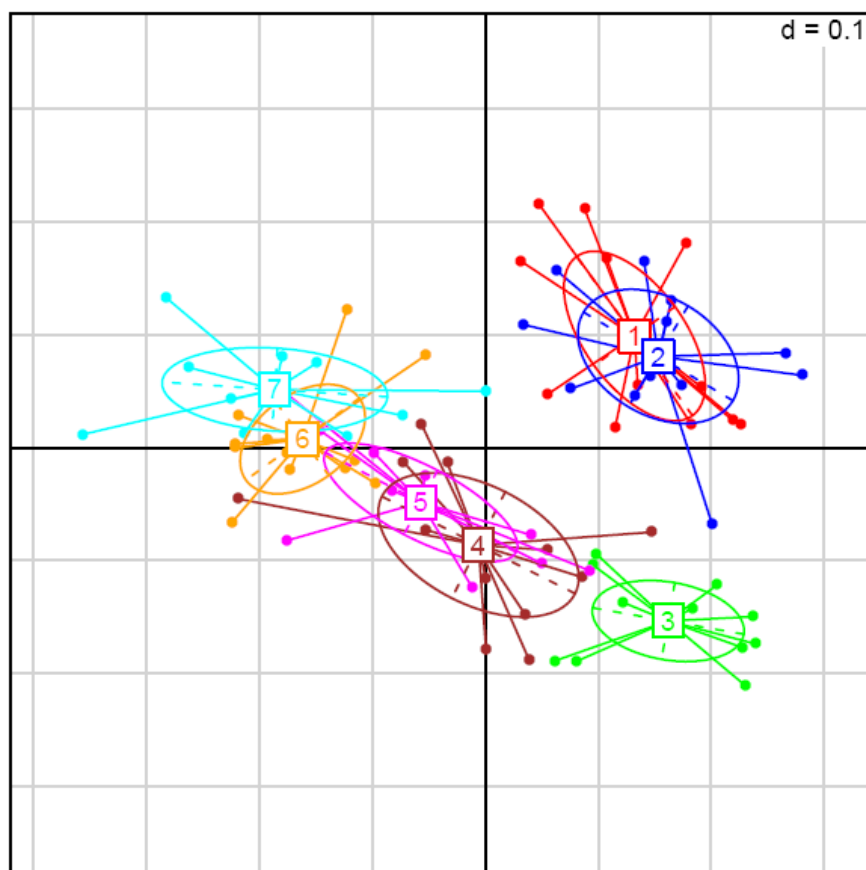


Abb. 12: Gruppenanalyse: Peripartaler Verlauf des Lipidoms aller 12 Kühe in der Übersicht (eine Farbe entspricht einem Messzeitpunkt: 1 = Zeitpunkt -14; 2 = Zeitpunkt -7; 3 = Zeitpunkt 0; 4 = Zeitpunkt +7; 5 = Zeitpunkt +14; 6 = Zeitpunkt +21; 7 = Zeitpunkt +28).

Gruppenanalyse der Lipidome nach peripartalem Zeitpunkt aufgetrennt - postpartal

Werden nur die Proben 4 („+7“) bis 7 („+28“) jeder Kuh in der Gruppenanalyse berücksichtigt, so zeigten sich die Unterschiede im Lipidom zwischen den postpartalen Probezeitpunkten noch deutlicher (Abb. 13).

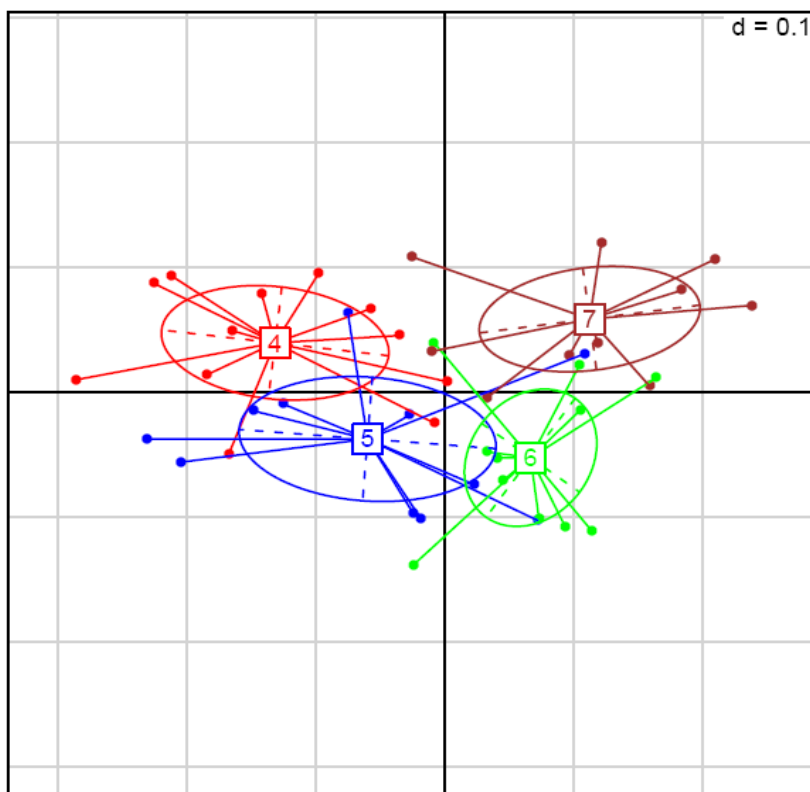


Abb. 13: Gruppenanalyse: Postpartaler Verlauf des Lipidoms aller 12 Kühe in der Übersicht (Zeitpunkt +7 bis +28; eine Farbe entspricht einem Messzeitpunkt).

Lipidomvergleich aller Kühe: präpartal und postpartal

Die Varianzen der einzelnen Proben führten zu einer deutlichen Auftrennung zwischen präpartalen und postpartalen Entnahmezeitpunkten (Abb. 14).

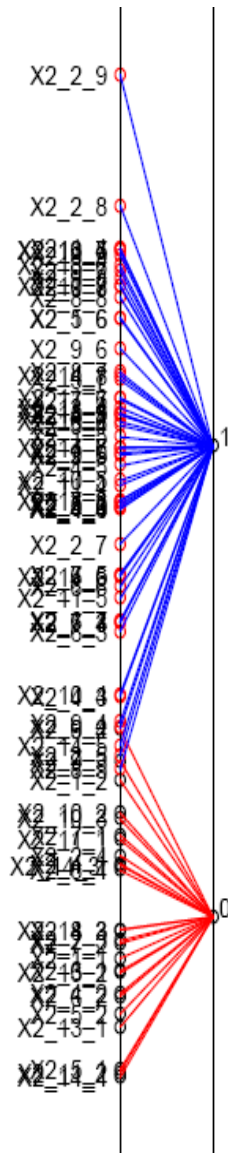


Abb. 14: Gruppenanalyse: Unterschiede im Lipidom (Gesamtheit der Intensitäten der gemessenen Massen) zwischen allen präpartal (Zeitpunkt 0, rot) und allen postpartal entnommenen Blutproben (Zeitpunkt 1, blau) aller 12 Kühe (Varianzen).

Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppenanalysen (Abb. 15 und 16). Präpartal zeigten sich die einzelnen Lipidome relativ deckungsgleich. Postpartal fand dann eine Aufspaltung statt. Die Kuh 6 zeigte keine Überschneidung mit allen anderen Lipidomen.

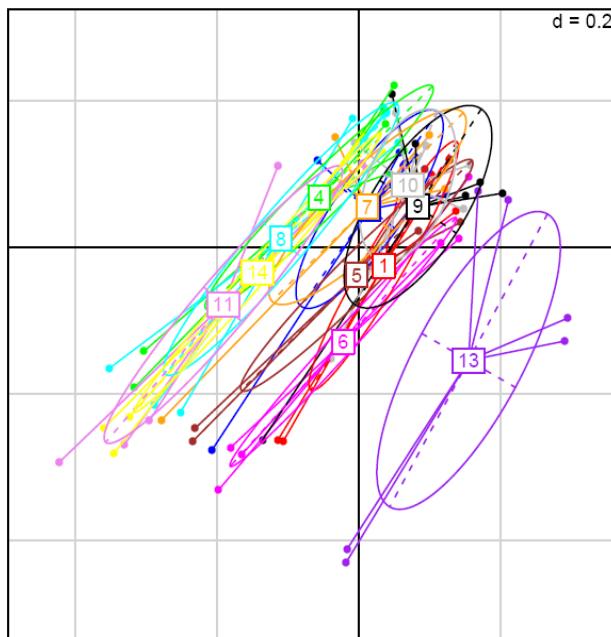


Abb. 15: Gruppenanalyse: Lipidome aller Kühe vom Zeitpunkt -14 bis zum Zeitpunkt 0 (eine Farbe entspricht einem Tier).

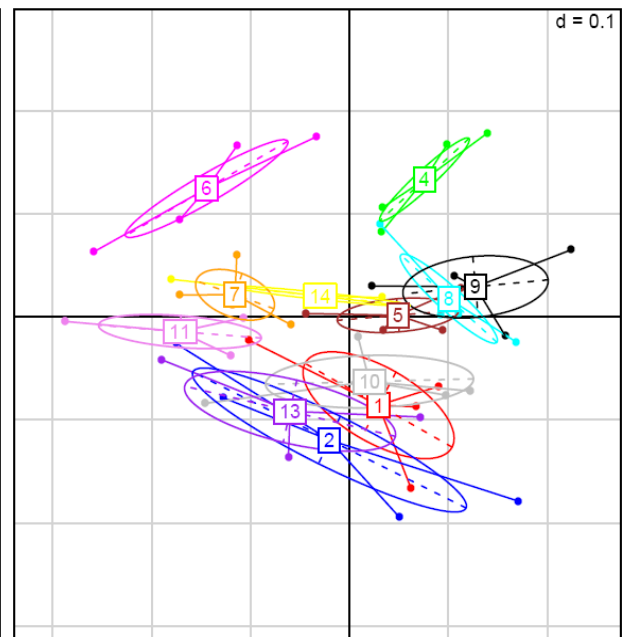


Abb. 16: Gruppenanalyse: Lipidome aller Kühe vom Zeitpunkt +7 bis zum Zeitpunkt +28 (eine Farbe entspricht einem Tier).

Lipidomvergleich aller Kühe: präpartal und postpartal, eingeteilt nach histologischer Klassifizierung

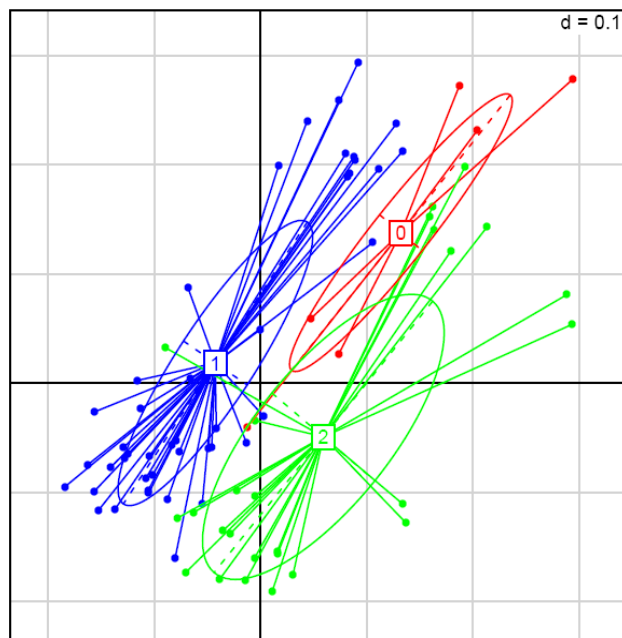


Abb. 17: Gruppenanalyse: Lipidom aller Kühe vom Zeitpunkt -14 bis zum Zeitpunkt 0 (eine Farbe entspricht einer histologischen Kategorie; 0 = normale Leber, 1 = leichtgradiges FLS, 2 = mittelgradiges FLS).

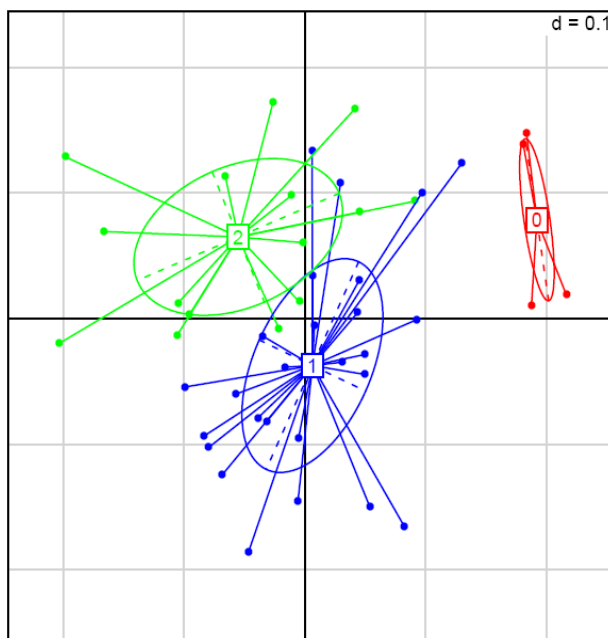


Abb. 18: Gruppenanalyse: Lipidom aller Kühe vom Zeitpunkt +7 bis zum Zeitpunkt +28 (eine Farbe entspricht einer histologischen Kategorie; 0 = normale Leber, 1 = leichtgradiges FLS, 2 = mittelgradiges FLS).

Auch in dieser Aufteilung (Abb. 17 und 18) fielen die beiden Gruppenanalysen sehr unterschiedlich aus. Bei den ersten drei Blutproben jedes Tieres überlagerten sich alle drei Histologiekategorien. Bei den postpartalen Proben konnte die Kategorie 0 (normale Leber) deutlich von den Kategorien mit FLS abgegrenzt werden. Auch zwischen den Kategorien 1 (leichtgradiges FLS) und 2 (mittelgradiges FLS) war die Tendenz eines unterschiedlichen Lipidoms sichtbar, jedoch dürfte die Abspaltung noch deutlicher ausfallen.

Nach Feststellung der Unterschiede in den diversen Gruppenanalysen wurden diejenigen Massen bzw. die dazugehörigen Lipide, die die Hauptveränderungen des Lipidoms sowohl im Verlaufe des Peripartums sowie zwischen den unterschiedlichen Leberverfettungsgraden begründen, eruiert. Die Intensitäten der jeweiligen Massen wurden dabei auf den internen Standard normalisiert, um verschiedene Proben besser miteinander vergleichen zu können. Dabei wurde für die Unterschiede im peripartalen Verlauf (Abb. 12) eine grössere Anzahl Massen (40 Lipide unterschiedlicher Lipidklassen - TAG, Cholesterole, Lysophosphocholine und Phosphocholine) entdeckt, deren Intensität im Verlauf des Peripartums deutlich zu- oder abnahm, wobei sich der Verlauf innerhalb einer Lipidklasse sehr ähnlich zeigte. Nachfolgend sind von jeder dabei auftretenden Lipidklasse beispielhaft ein oder zwei Verläufe während der Transitphase dargestellt (Abb. 19 bis 22). Dabei wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der Intensität der jeweiligen Masse aller 12 Tiere (Y-Achse) zu jedem Messzeitpunkt (X-Achse) aufgezeichnet.

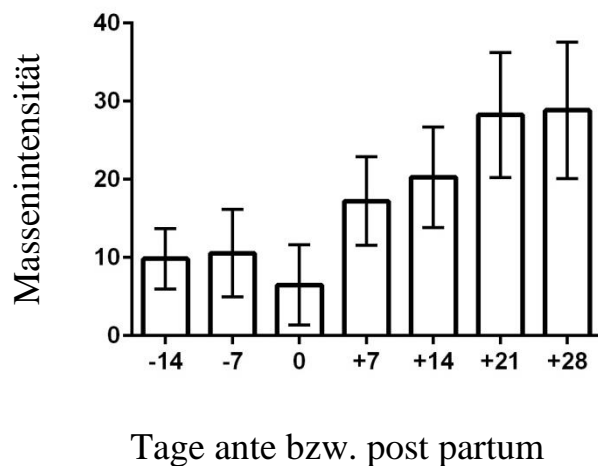
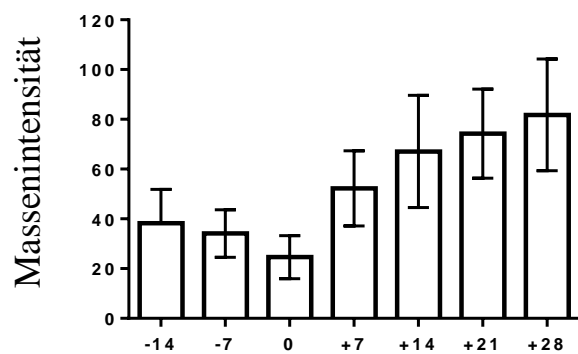
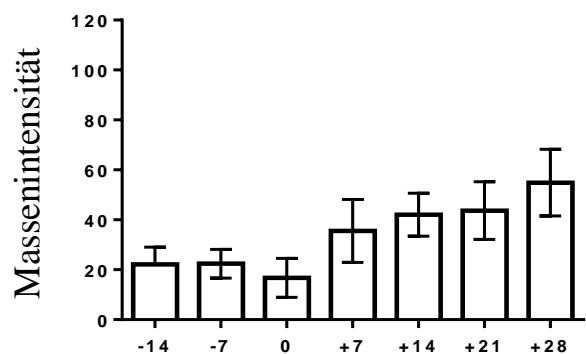


Abb. 19: Verlauf der Massenintensität von Lipid m/z 1185.838 als Beispiel für den Verlauf der Cholesterole (Mittelwert aller 12 Tiere mit Standardabweichung) im Peripartum (Tag -14 bis Tag 28).

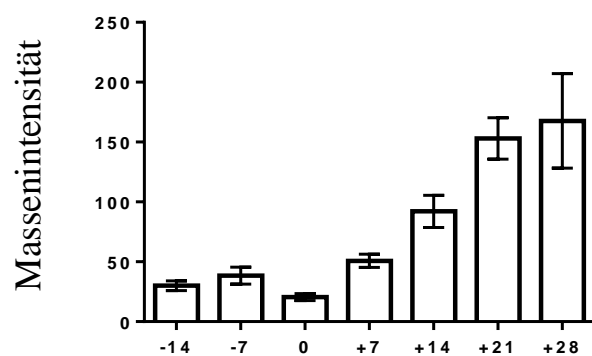


Tage ante bzw. post partum

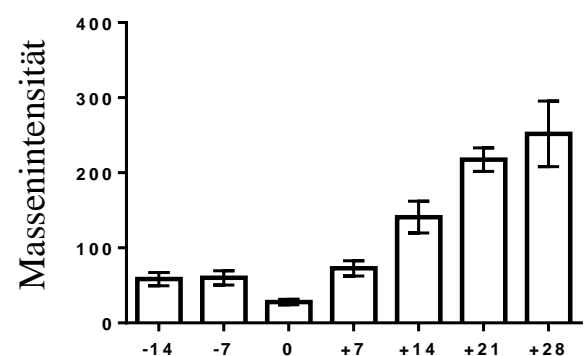


Tage ante bzw. post partum

Abb. 20: Verlauf der Massenintensität von Lipid m/z 518.327 und Lipid m/z 542.324 als Beispiele für den Verlauf der Lysophosphocholine (Mittelwert aller 12 Tiere mit Standardabweichung) im Peripartum (Tag -14 bis Tag 28).



Tage ante bzw. post partum



Tage ante bzw. post partum

Abb. 21: Verlauf der Massenintensität von Lipid m/z 758.726 und Lipid m/z 786.764 als Beispiel für den Verlauf der Phosphocholine (Mittelwert aller 12 Tiere mit Standardabweichung) im Peripartum (Tag -14 bis Tag 28).

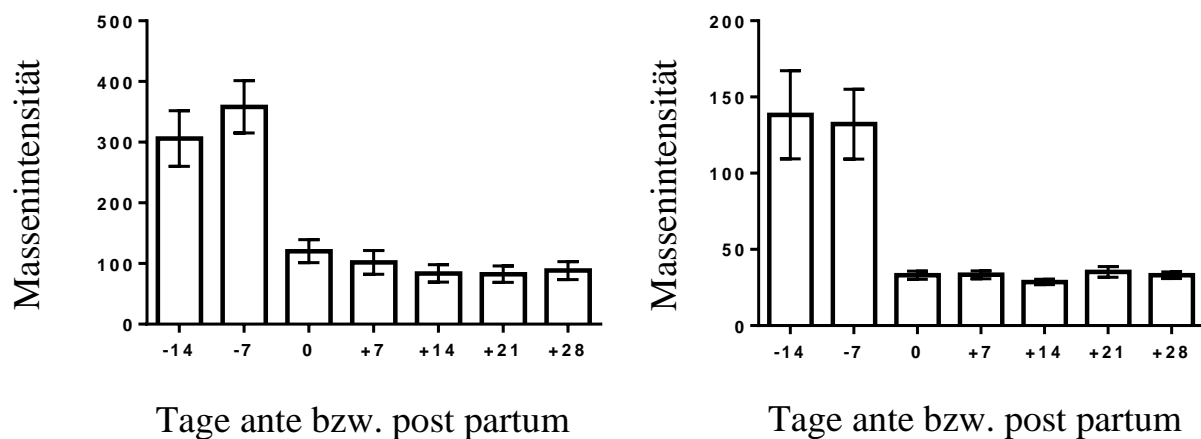


Abb. 22: Verlauf der Massenintensität von Lipid m/z 855.731 und Lipid m/z 873.754 als Beispiel für den Verlauf der TAG (Mittelwert aller 12 Tiere mit Standardabweichung) im Peripartum (Tag -14 bis Tag 28).

Die meisten Lipidarten (Cholesterole, Lysophosphocholine und Phosphocholine) zeigten präpartal einen abnehmenden Verlauf mit Tiefstwert um die Geburt, um nach der Geburt deutlich und über die Ausgangswerte zum Zeitpunkt -14 anzusteigen. Einen entgegengesetzten Verlauf zeigten hingegen die Triazylglyzerole. Sie erreichten zwar in den meisten Fällen auch einen Tiefstwert um die Zeit der Geburt, waren aber präpartal deutlich höher als postpartal und stiegen postpartal nur noch minimal an oder stagnierten auf dem Niveau zum Zeitpunkt 0. Von den Massen, die postpartal die Unterschiede im Lipidom zwischen den Verfettungsgraden ausmachten, wurden Übersichtsdiagramme erstellt. Dabei wurden die Massenintensitäten zu allen Zeitpunkten vom Tag +7 bis zum Tag +28, nach Schweregrad eingeteilt, aufgezeigt. Es wurden 20 Massen für diese Unterschiede verantwortlich gemacht. Bei mehreren Massen nahm die Intensität mit zunehmendem FLS zu (Abb. 23) oder ab (Abb. 24), und bei 5 Massen bestand kein klarer Zusammenhang zwischen Intensität und Grad des FLS. Bei vielen dieser Massen, besonders bei denen aus den Gruppen der Phosphatidylcholinen und Triglyzeriden, konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Massenintensität zwischen den Schweregraden dargestellt werden.

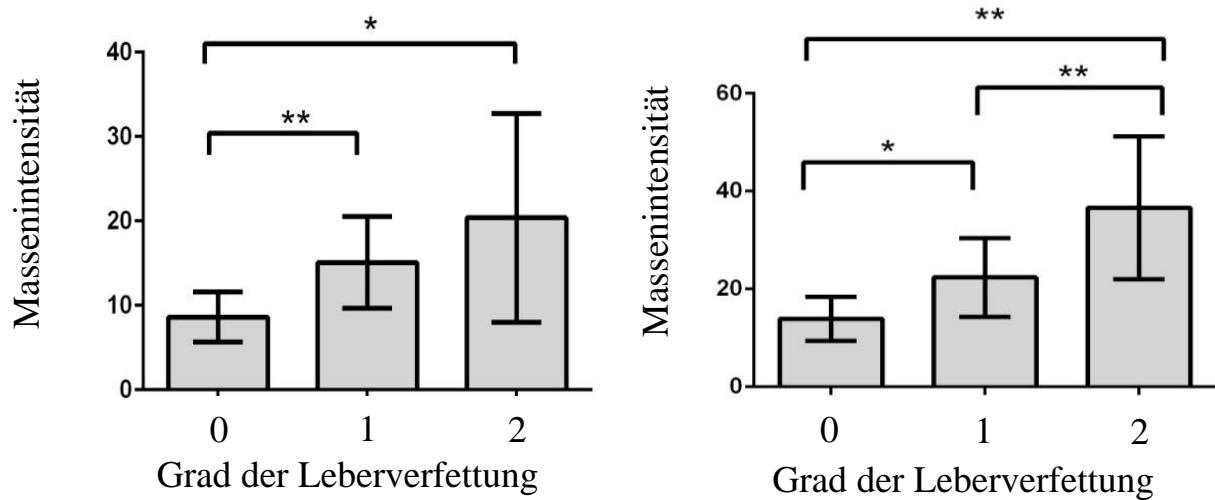


Abb. 23: Intensität der mit Zunahme des FLS ansteigenden Massen (m/z), die für die Aufspaltung des Lipidoms postpartal verantwortlich waren (Zeitpunkte +7 bis +28; Mittelwert aller Tiere der jeweiligen Gruppe): 0 = normal; 1 = leichtgradige Leberverfettung; 2 = mittelgradige Leberverfettung; $m/z = 758.889$ (links) bzw. 327.224 (rechts); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney-Test).

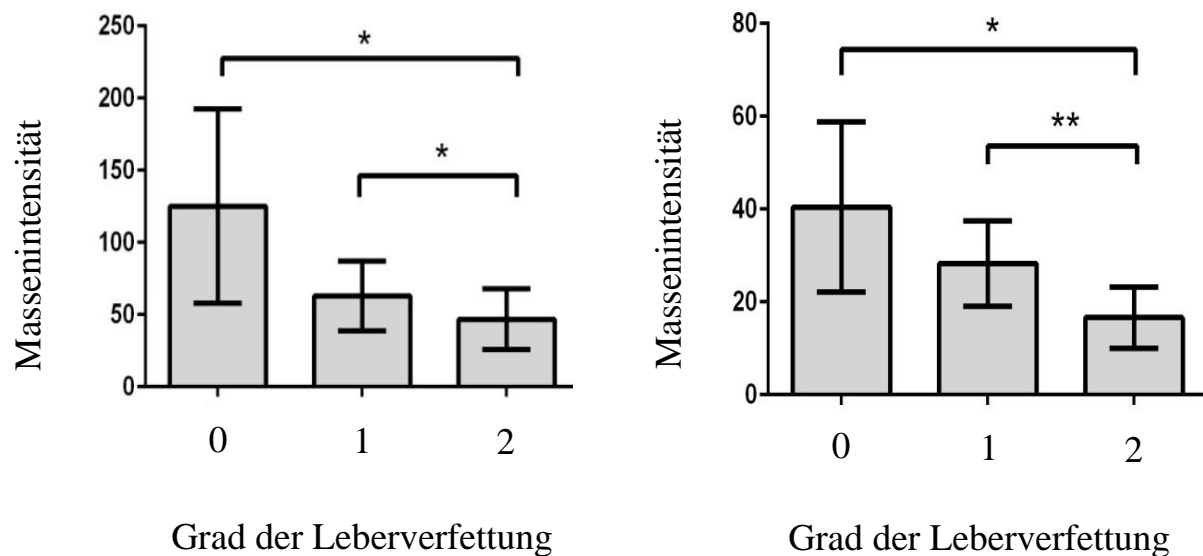


Abb. 24: Intensität der mit Zunahme des FLS sinkenden Massen (m/z), die für die Aufspaltung des Lipidoms postpartal verantwortlich waren (Zeitpunkte +7 bis +28; Mittelwert aller Tiere der jeweiligen Gruppe): 0 = Normal; 1 = Leichtgradige Leberverfettung; 2 = Mittelgradige Leberverfettung; $m/z = 913.805$ (links) bzw. 920.864 (rechts); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney-Test).

6.8. Ergebnisse der Metabolomik

Die Ergebnisse basieren auf Messungen im Positiv-ESI-Modus.

Gruppenanalyse des Metaboloms aller Kühe im Überblick

Die Kühe liessen sich in drei Gruppen einteilen (Abb. 25). Die Kuh 1 wies ein von den anderen Kühen stark abweichendes Metabolom auf, während die Kühe 2, 4, 5, 7, 9, 11 und 13 sowie die Kühe 6, 8, 10 und 14 je eine eigenständige Gruppe bildeten, die sich auch deutlich von den anderen Gruppen abgrenzte. Innerhalb einer Gruppe stellten sich die Metabolome jedoch sehr deckungsgleich dar. Die Kühe einer Gruppe wiesen histologisch uneinheitliche Leberverfettungsgrade auf.

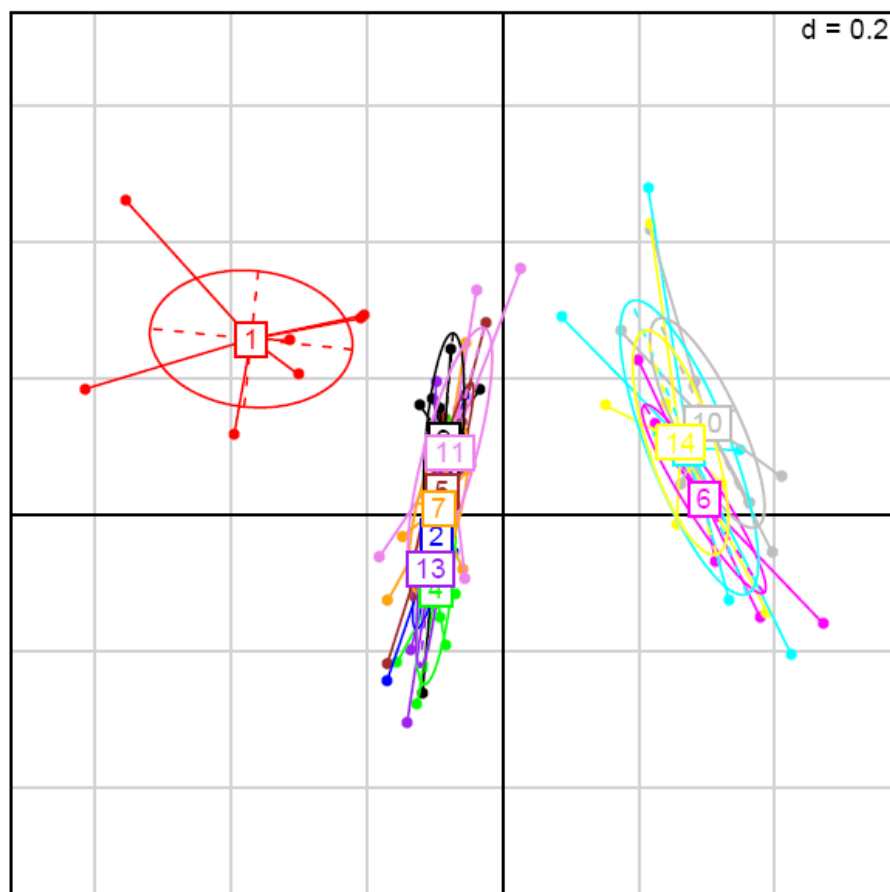


Abb. 25: Gruppenanalyse: Vollständiges Metabolom aller 12 Kühe in der Übersicht (eine Farbe entspricht einer Kuh).

Gruppenanalyse der Metabolome aufgetrennt nach peripartalem Zeitpunkt

Im Gegensatz zum Lipidom waren die einzelnen Messzeitpunkte beim Metabolom nur unwesentlich abweichend (Abb. 26). Es fand keine metabolomische Aufspaltung nach Zeitpunkten statt.

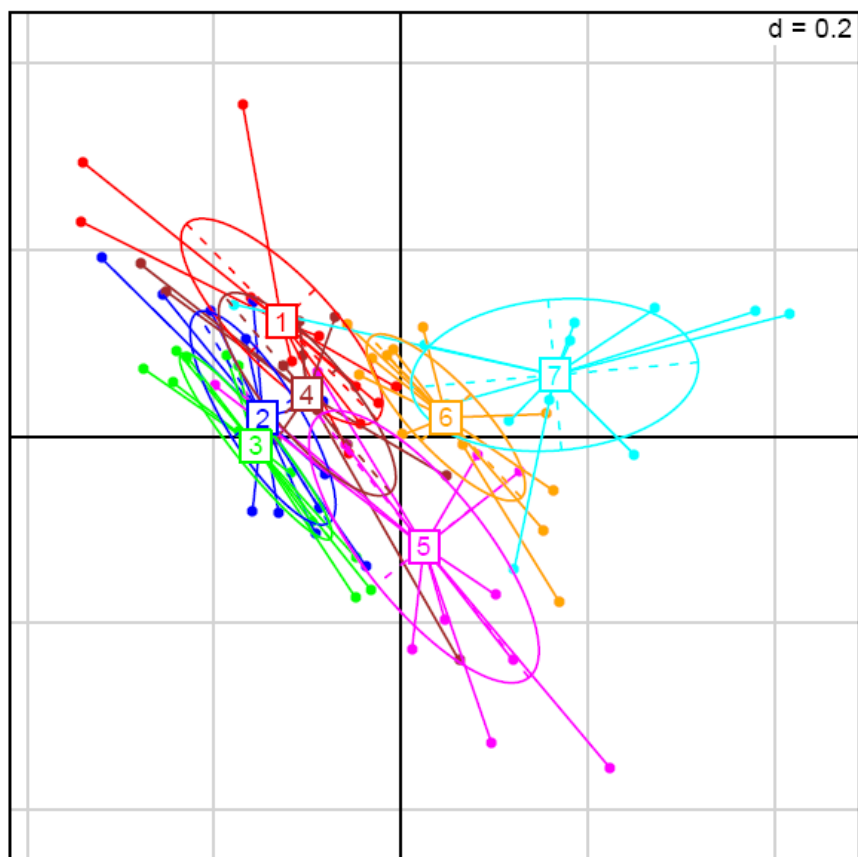


Abb. 26: Gruppenanalyse: Peripartaler Verlauf des Metaboloms aller 12 Kühe im Überblick (eine Farbe entspricht einem Messzeitpunkt).

Metabolomvergleich aller Kühe - postpartal, eingeteilt nach histologischer Klassifizierung

Bei der Auftrennung der postpartalen Metabolome nach histologischer Klassifizierung der Leber zeigte sich, dass sich das Metabolom der Kühe in den 2 bis 4 Wochen nach der Geburt je nach histologischem Verfettungsgrad der Leber so stark unterschied, dass die einzelnen Histologiekategorien als Gruppe in der Gruppenanalyse erkennbar waren (Abb. 27).

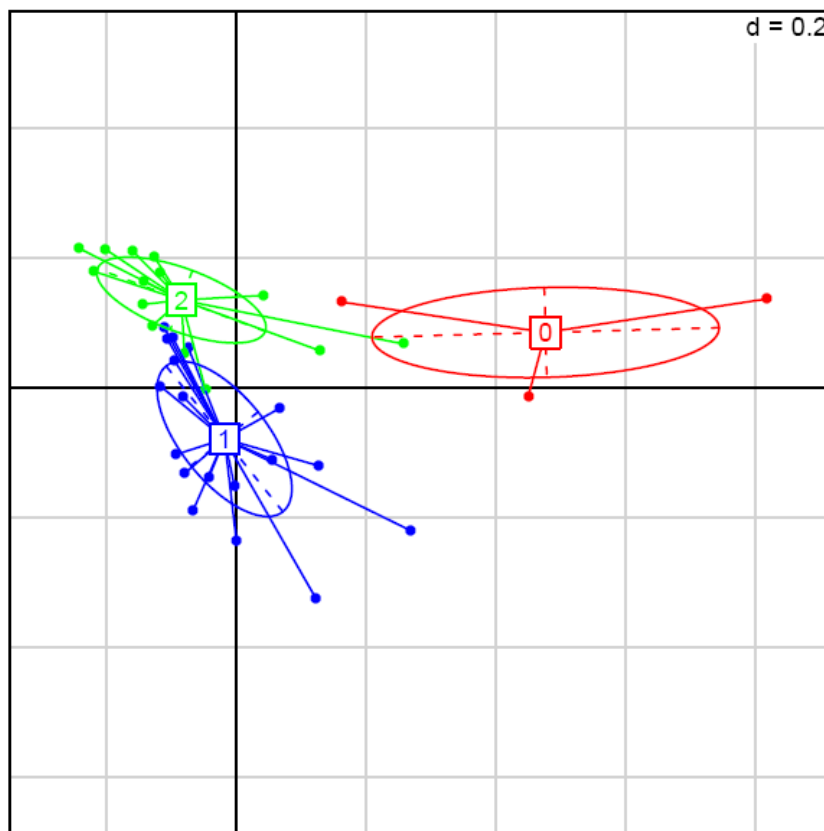


Abb. 27: Gruppenanalyse: Vergleich der letzten drei Proben (+14 bis +28) der Metabolomik aller 12 Kühe im Überblick (eine Farbe entspricht einem Histologiegrad: 0 = Normal; 1 = Leichtgradige Leberverfettung; 3 = Mittelgradige Leberverfettung).

7. DISKUSSION

7.1 Versuchsdurchführung

7.1.1. Wahl der Versuchstiere

Für die Probenentnahmen wurden nur Tiere aus derselben Herde berücksichtigt, da nach GRIFFITHS et al. (2010) Studien an Patienten für die Entwicklung diagnostischer Biomarker wichtige Daten liefern, jedoch immer noch Fehler durch die Aufnahme unterschiedlicher Nahrung und durch Veränderungen physiologischer Bedingungen möglich sind. KIRWAN (2013) nannte Alter, Rasse, Geschlecht, Fütterung, Medikation und den hormonellen Status als potentiell störende Faktoren. Deshalb wurde darauf geachtet, Management, Futter und Rasse aller Tiere während des Versuchszeitraums so konstant wie möglich zu halten. Das Alter und die Parität der Tiere variierten jedoch relativ stark und auch die Medikation einiger Tiere konnte nicht verhindert werden. Zudem wurde auch versucht, jedes Tier während des Versuchszeitraums so konstant wie möglich zu halten, da die Tiere auch mit sich selbst über verschiedene Zeitpunkte verglichen wurden.

Die Vereinheitlichung der Herde, des Managements und der Tagesabläufe sind Vorteile dieses Projektes im Vergleich zu früheren Studien (GUBLER, 2012), bei denen Blut von Tieren aus unterschiedlichen Beständen und unterschiedlicher Rassen retrospektiv für die Lipidomuntersuchungen verwendet wurden. Der Nachteil besteht dabei in der limitierten Anzahl vergleichbarer Versuchstiere. Es benötigt mehr Zeit, um dieselbe Anzahl Versuchstiere zu beproben als bei Parallelversuchen mit verschiedenen Herden. So stand uns nach Erhalt der histologischen Diagnosen beispielsweise nur ein Tier ohne veränderten histologischen Leberbefund zur Verfügung. Deshalb muss bei der Beurteilung der Ergebnisse immer berücksichtigt werden, dass die Gruppe „Schweregrad 1“ nur bedingt repräsentativ ist.

7.1.2. Probenentnahme und -verarbeitung

Zur Blutentnahme wurde die Jugularvene gewählt, da WILHELM et al. (2013) bei der Untersuchung von Blutproben aus der Vena jugularis externa und anderen leicht zugänglichen Venen zeigen konnten, dass der Entnahmeort einer Blutprobe einen entscheidenden Einfluss auf Stoffwechseluntersuchungen hat. Diese Autoren zogen aus diesem Grund für solche Untersuchungen die Entnahme aus der Jugularvene derjenigen aus der Schwanzvene und der Eutervene vor. Zudem besteht bei einer Entnahme aus der Schwanzvene ein höheres Risiko einer Hämolyse des entnommenen Bluts oder einer Entnahme einer Mischprobe aus venösem und arteriellem Blut als bei anderen Entnahmestellen (BERTONI und TREVISI, 2013).

Bei dieser Studie wurde versucht, alle Proben möglichst zur gleichen Tageszeit zu entnehmen. Zudem waren sowohl das verwendete Antikoagulans, das benötigte Material zur Blutentnahme, die Aufbewahrung des Bluts bis zur Auswertung, die Temperatur bei der Probenverarbeitung als auch die Anzahl Gefrierzyklen (ein Zyklus) identisch. Ein einmaliger Gefrierzyklus hat keinen Einfluss auf die Stabilität der Proben (ZHANG et al., 2007; SCALBERT et al., 2009) und Serum kann mindestens einen Monat eingefroren werden, ohne dass die NEFA-Resultate verfälscht werden (LEBLANC, 2010).

Der Grund für die Vereinheitlichung bei der Probenentnahme und -verarbeitung liegt darin, dass bei metabolischen Untersuchungen Unterschiede innerhalb einzelner Parameter entstehen können, wenn diese nicht zu den gleichen Bedingungen entnommen wurden. Nach NIELSEN et al. (2003) können, besonders bei der Messung von BHB und NEFA, tageszeitliche Unterschiede bei den Plasmawerten dieser beiden Metaboliten festgestellt werden. Die Konzentration von BHB im Plasma wird zudem durch die Fütterungszeit, die Fütterungsfrequenz und das Futter beeinflusst. Wird, wie im vorliegenden Projekt, eine Total-Misch-Ration gefüttert, so werden die tageszeitlichen Schwankungen von BHB im Plasma weitgehend ausgeglichen (NIELSEN et al., 2003; BERTONI und TREVISI, 2013). Da versucht

wurde, alle Probenentnahmen und die Rahmenbedingungen der Versuchstiere zu standardisieren, war es möglich, alle Blutwerte eines Tieres und die Werte verschiedener Tiere miteinander zu vergleichen.

7.2. Gruppeneinteilung

Für den Vergleich der Lipidome zwischen verschiedenen Kühen wurden die Kühe nach histologischem Verfettungsgrad der Leber eingeteilt. Weitere Faktoren, wie zusätzliche bzw. andere Erkrankungen als eine Leberverfettung, wurden dabei nicht berücksichtigt. Dafür wäre eine Studie mit einer grossen Anzahl an Versuchstieren nötig, bei der alle Tiere von einer identischen Krankheit betroffen wären. Dies ist jedoch in der peripartalen Phase schwierig, da zu dieser Zeit viele Tiere multiple gesundheitliche Probleme zeigen. Alternativ könnte eine Studie mit grösserer Tierzahl durchgeführt werden, bei der alle Tiere mit Anzeichen anderer Erkrankungen als das FLS während der Versuchsdurchführung vom Experiment ausgeschlossen werden könnten.

Durch die unregelmässige Verteilung innerhalb der Gruppen gab es nur ein Tier, das kein FLS aufwies. Zudem war es aus praktischen Gründen nicht immer möglich, zwischen zwei Blutproben eines Tieres denselben Abstand zu wahren und beispielsweise die Probe „-7“ immer genau am 7. Tag vor der Geburt zu entnehmen. Zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten fanden jedoch im Vergleich unter allen Tieren keine Überschneidungen statt. Präpartal lagen zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten mindestens ein Tag und postpartal mindestens drei Tage.

7.3. Leberbiopsie

Ein wichtiger Punkt bei der kritischen Beurteilung der Ergebnisse bildet die Zuverlässigkeit der histologischen Diagnose. Eine Leberbiopsie repräsentiert nur einen Bruchteil der ganzen Rinderleber. Nach HERDT und GERLOFF (2008) fehlt eine klare Dokumentation, dass Fett in der Leber immer homogen verteilt ist. Nach

KARSAI und SCHÄFER (1984) betreffen metabolische Erkrankungen wie das FLS aber ganze Organe und die Veränderungen sind diffus verteilt. Deshalb gingen sie davon aus, dass von einer Biopsie auf den Zustand der ganzen Leber geschlossen werden kann. Auch VAN DORLAND und BRUCKMAIER (2010) unterstützten die Annahme, dass eine Leberbiopsie repräsentativ für die ganze Leber ist. Es existieren aber auch Fallberichte von fokalen Leberverfettungen bei Rindern (MOHAMED et al., 2004) und beim Menschen (NG und NG, 1996).

7.4. Lipidextraktion

Die Lipidextraktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies war wichtig, um eine Lipidperoxidation und -hydrolyse zu verhindern (KHALIL et al., 2010). Sie erfolgte mit der Methode nach MATYASH und LIEBISCH (2008) mit MTBE, da dies nach GUBLER (2012) die geeignetste Methode zur Lipidextraktion ist. Bei diesem Vorgehen sammelt sich die nicht extrahierbare unlösliche Matrix am Grund eines Behälters und die lipidhaltige organische Phase schwimmt oben auf. Dies vereinfacht die reine Gewinnung der Lipide. Bei den Methoden nach FOLCH et al. (1956) und BLIGH und DYER (1959) gelangten nach GUBLER (2012) bei der Extraktgewinnung, da bei diesen Methoden die lipidhaltige Phase nicht oben aufschwamm, jedes Mal auch Teile der unlöslichen Matrix mit in die gewonnene Flüssigkeit, sodass jeweils ein unlöslicher Niederschlag ersichtlich war.

Die Zugabe eines internen Standards vor der Extraktion führte dazu, dass Probleme mit der Vergleichbarkeit zwischen einzelnen „-omics“ Daten umgangen werden konnten, indem eine Standardisierung und Kontrolle durchgeführt wurde. So liessen sich nicht nur die Variabilität in der Probenvorbereitung, sondern auch Matrixeffekte und andere Störeffekte auf die Analyten in der Probe minimieren (GRIFFITHS et al., 2010).

7.5. Einflüsse des experimentellen Designs auf das Lipidom

Bei der Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, während der ganzen Experimentdauer für alle Tiere dieselben äusseren Bedingungen zu schaffen. Dies erfolgte aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen den Tieren. Dennoch gibt es einige Faktoren, deren Einfluss auf das Lipidom nicht abgeschätzt werden kann, und die - aufgrund der kleinen Tieranzahl oder des Managements - nicht aus den Versuchen zu streichen waren. Dazu gehören die partielle Weidefütterung, das Auftreten anderer Erkrankungen als des FLS und die Gabe von Medikamenten. In den Verlaufsdiagrammen von NEFA und BHB fallen die von Medikamenten betroffenen Proben jedoch nicht speziell auf im Vergleich mit anderen Proben desselben Tieres, was den Schluss zulässt, dass diese Proben, bezüglich der Messung von NEFA und BHB wie alle anderen Proben gehandhabt werden können.

7.6. NEFA-Bestimmungen

Der durchgeführte Test zur Messung der NEFA-Werte in den Plasmaproben wurde für Serumproben entwickelt. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Zudem wird in der Packungsbeilage erwähnt, dass Heparin eine Stimulierung der Lipoprotein-Lipase bewirken kann, was wiederum zu einem Anstieg der freien Fettsäuren führt. ROGIERS (1978) hatte dagegen in seinen Untersuchungen festgestellt, dass Heparin keinen Einfluss auf die NEFA-Werte hat. Da alle vorliegenden Proben gleich viel Heparin enthielten und auch alle Proben aus Plasma und nicht aus Serum bestanden, konnten die Werte untereinander verglichen werden. Die erwähnten Punkte sollten jedoch bei einem Vergleich mit anderen Studien berücksichtigt werden.

Gemäss Herstellerangaben beträgt die Probenstabilität für die NEFA-Bestimmung bei 4 °C zwei Tage. Diese Bedingung wurde bei der Versuchsdurchführung eingehalten. Auch ROGIERS (1978) erkannte keine Veränderungen im NEFA-Muster und in der totalen NEFA-Konzentration, wenn das Plasma höchstens 6 h bei

Raumtemperatur oder höchstens 48 h bei 4 °C aufbewahrt wurde. Auch bei Vollblut, das 3 bis 4 h bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, blieb die totale NEFA-Konzentration konstant (ROGIERS, 1978). Beim vorliegenden Experiment sollte der Transport des Vollbluts zur Zentrifugation, vom Stall ins Labor, also keine Veränderungen der NEFA-Werte bewirkt haben, da die Dauer des Transports 4 h in keinem Fall überschritt.

Die Aufbewahrung der Plasmaproben bei -80 °C sollte kein Problem der Verfälschung darstellen. Während dieser Zeit sollten sich in den Plasmaproben befindliche TAG und Phospholipide im Fettsäureprofil nicht signifikant verändert haben (MATTHAN et al., 2010).

7.7. BHB-Bestimmungen

In der Anleitung zur LiquiColor-Prozedur wird erwähnt, dass es sich bei dem Test um ein Verfahren für Serum oder Plasma handelt. Die Stabilität der untersuchten Proben stellte auch hier kein Problem dar, da die Bestimmung sofort nach dem Auftauprozess erfolgte und die Probenstabilität für die BHB-Bestimmung gemäss Anbieter bei 2 - 8 °C 7 Tage beträgt.

7.8. Versuchsergebnisse - BCS, NEFA und BHB

7.8.1. Verlauf des BCS

Die postpartale Abnahme des BCS, bei den meisten Tieren mit fortschreitender Versuchsdauer, kann damit erklärt werden, dass sich die Tiere während dieser Zeit in einer negativen Energiebilanz befanden. Dies konnte durch eine hohe Milchleistung, kombiniert mit einer postpartal verminderten Fresslust sowie allfälligen Erkrankungen bedingt sein, die die Fresslust noch zusätzlich hemmten.

7.8.2. Verlauf der NEFA- und BHB-Konzentrationen

7.8.2.1. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Höchstwerte aller Messungen innerhalb eines Tieres traten im Allgemeinen bei den NEFA (Probe 0) früher auf als beim BHB (Probe +7 oder +14). Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass die postpartale NEB zu einer verstärkten Lipolyse im Körper führte. Dies wiederum führte zu erhöhten NEFA-Konzentrationen im Blut, die nach Hydrolyse von TG entstanden. Die Leber nahm diese NEFA aus dem Blut auf und oxidierte einen Teil davon partiell zu Ketonkörpern, also u. a. zu BHB, die dann wiederum ins Blut sezerniert wurden.

Die BHB-Werte streuten stärker als die NEFA-Werte. Dies könnte damit erklärt werden, dass die NEFA in der Leber verschiedene Stoffwechselwege einschlagen können und die partielle Oxidation zu BHB davon nur eine Möglichkeit darstellte.

7.8.2.2. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

In der Literatur werden prä- und postpartal unterschiedliche Normalwerte für die NEFA- und BHB-Konzentrationen angegeben (ADEWUYI et al., 2005; HASKELL, 2008; LEBLANC, 2010; STENGÄRDE, 2010; ANDRES CONTRERAS und SORDILLO, 2011; ROBERTS, 2012; BERTONI und TREVISI, 2013; OSPINA et al., 2013). Deshalb wurden plausible Maximalwerte bestimmt, die mit den Messungen der NEFA- und BHB-Konzentrationen verglichen werden konnten: für NEFA 0.4 und 0.7 mmol/l (prä- bzw. postpartal) und für BHB 600 und 1400 µmol/l (prä- bzw. postpartal).

Beim Vergleich der Ergebnisse der NEFA- und BHB-Messungen mit den genannten Grenzwerten lagen im vorliegenden Experiment bei den BHB-Werten prä- und postpartal jeweils 8 Kühe über dem jeweiligen Grenzwert. Bei den NEFA-Werten lagen präpartal 6 Tiere und postpartal sogar alle 12 Tiere mindestens einmal über den Grenzwerten. Es zeigten also auch Tiere mit histologisch normaler oder nur leichtgradig veränderter Leber zu hohe NEFA- und BHB-Konzentrationen, wenn

sie mit den gängigen Grenzwerten aus der Literatur verglichen wurden (ADEWUYI et al., 2005; HASKELL, 2008; LEBLANC, 2010; STENGÄRDE, 2010; ANDRES CONTRERAS und SORDILLO, 2011; ROBERTS, 2012; BERTONI und TREVISI, 2013; OSPINA et al., 2013).

Nach LEBLANC (2010) beginnt die NEFA-Konzentration zwei bis vier Tage präpartal anzusteigen. Dies deutete sich auch in der vorliegenden Studie an, jedoch wurden die Messung der NEFA- und BHB-Werte im vorliegenden Experiment nur wöchentlich und nicht täglich bei jedem Tier durchgeführt. Zudem stiegen die NEFA-Werte schon zwischen den Proben -14 und -7 leicht an (Faktor 1.16). Der grösste Anstieg zwischen zwei nachfolgenden Proben erfolgte aber zwischen den Proben -7 und 0 (Faktor 1.85), also in der von LEBLANC erwähnten Zeitspanne. Nach ADEWUYI et al. (2005) erreichen die NEFA ihren Peak um die Geburt. Dies war im vorliegenden Experiment bei 5 von 12 Tieren der Fall (Zeitpunkt 0). Die anderen 7 Tiere erreichten den Peak erst einige Tage bis Wochen nach der Geburt. WEBER et al. (2013) erwähnten, dass die höchsten Plasma-NEFA-Konzentrationen am Tag 7 oder 14 post partum auftraten und danach wieder sanken. In der vorliegenden Arbeit traten die höchsten NEFA-Konzentrationen bei 5 Tieren zum Zeitpunkt 0, kurz nach der Geburt, auf, bei 3 Tieren zum Zeitpunkt +7 und bei weiteren 4 Kühen zu einem späteren Zeitpunkt nach der Geburt. Die NEFA-Konzentrationen erreichten ihre Peaks also tendenziell früher als von WEBER et al. (2013) beschrieben.

7.8.3. NEFA und Leberhistologie

Zum Zeitpunkt +14 konnte zwischen den Kategorien „leichtgradige Leberverfettung“ und „mittelgradige Leberverfettung“ ein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($P = 0.01$; Mann-Whitney-Test). Dabei waren die NEFA-Konzentrationen der Gruppe „mittelgradige Leberverfettung“ signifikant höher als die Werte der Gruppe „leichtgradige Leberverfettung“. Es sind jedoch noch Daten von mehr

Tieren notwendig, um zu untersuchen, ob auch zwischen den Gruppen „normale Leber“ und „leichtgradiges FLS“ zu diesem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bestehen.

7.9. Lipidomik und Metabolomik

7.9.1. Lipidomik

7.9.1.1. Vorgehen Lipidomik

Im vorliegenden Projekt war die Untersuchung des Lipidoms über die gesamte peripartale Übergangsphase möglich. Es fand eine ungezielte Lipidomik (untargeted Lipidomic) statt. Deswegen war es schwieriger, den gefundenen Lipiden eine eindeutige chemische Struktur zuzuweisen. Die signifikant unterschiedlichen Massen konnten jedoch bestimmten Lipidgruppen zugeteilt werden (TAG, Cholesterole, Phosphocholine, Lysophosphocholine). Ein Problem bei der Interpretation der Gruppenanalysen bestand darin, dass nur ein Tier eine normale Leber hatte. Dies muss berücksichtigt werden, wenn man die nach Verfettungsgraden aufgetrennte Gruppenanalyse beurteilt. Die Tierzahl wurde einerseits durch den vorgegebenen Untersuchungszeitraum der Studie und andererseits durch die vorhandene Betriebsgrösse eingeschränkt.

Die vorliegenden Auswertungen basieren nur auf Messungen im Positiv-ESI-Modus. Dies liegt daran, dass die im Negativ-ESI-Modus gemessenen Versuche keine interpretierbaren Massenspektren lieferten. Auch GUBLER (2012) fand Massen, die sich im Lipidom von Holstein-Friesian-Kühen signifikant veränderten, besonders im Positiv-ESI-Modus. Deshalb sollten durch diese Einschränkung keine Informationsverluste entstanden sein.

Eine chromatografische Trennung der Moleküle war wichtig, da Lipide in verschiedenen Isotopen, mit ähnlichen Massen, vorliegen können. Die Kombination der Lipidomik- und Metabolomikmessung mit einer UPLC erfolgte aus dem Grund, dass diese Chromatografiemethode eine Thermostabilität der Moleküle nicht als

Bedingung voraussetzt. Thermostabilität kann aufgrund der nicht bekannten Bestandteile in der Probe und der biologischen Natur der Moleküle nicht gewährleistet werden. Zudem kann eine UPLC gut mit einer Elektronenspray-Ionisation kombiniert werden. Auch die Ionisationsmethode sollte nach Thermostabilität der Probeninhaltsstoffe gewählt werden. Für labile Moleküle wie Peptide, Proteine und andere biologische Stoffe sollte deshalb eine sanfte Ionisierungsmethode gewählt werden, wie im vorliegenden Beispiel die Elektronenspray-Ionisation oder alternativ eine Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation. CHEN et al. (2013) erwähnen, dass die Massenspektrometrie im Vergleich zu anderen Analysemethoden eine höhere Sensitivität aufweist.

7.9.1.2. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Lipidome aller Tiere, zu allen Messzeitpunkten, zeigten eine starke Deckungsgleichheit. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Probenentnahme und Messung korrekt erfolgten und dass, über die gesamte Peripartalphase, kein wesentlicher Unterschied im Lipidom zwischen den Tieren vorliegt. Im peripartalen Verlauf zeigten die unterschiedlichen Messzeitpunkte deutliche Unterschiede in den Lipidomen. Es konnte also eine deutliche Veränderung des Plasma-Lipidoms im Verlauf des Peripartums von Tag -14 bis Tag +28 beobachtet werden. Dies galt besonders für die postpartalen Messzeitpunkte. Die präpartal gewonnen Proben überlagerten im Lipidom stärker. Dies kann daran liegen, dass sich das Lipidom präpartal nicht stark verändert hat oder dass zwischen den ersten beiden Probenentnahmen die Zeit teilweise kürzer war als postpartal.

Postpartal fand zwischen einzelnen Kühen eine deutliche Aufspaltung des Lipidoms statt. Bei der Kuh 6 war keine Überschneidung mit allen anderen Lipidomen zu sehen. Sie war die einzige Kuh, die eine histologisch normale Leber aufwies. Dies ist ein Hinweis dafür, dass sich die Lipidome zwischen verschiedenen FLS-Graden unterscheiden. Dies wird auch durch diejenige Gruppenanalyse untermalt, die die

Lipidome nach Schweregrad der Leberverfettung einteilte: Die einzelnen Lipidome unterschieden sich postpartal deutlich. Besonders eindrücklich waren die Unterschiede zwischen Schweregrad 0 und 1 bzw. 2.

Es konnten deutliche Unterschiede im Lipidom sowohl im Verlaufe des Peripartums aller Tiere als auch zwischen den unterschiedlichen Schweregraden der Leberverfettung aufgezeigt und für diese Unterschiede verantwortliche Massen identifiziert werden. Ein weiterer Schritt besteht nun darin, diese Massen chemisch eindeutig zu identifizieren und in einer weiteren Studie mit grosser Tierzahl zu validieren.

7.9.1.3. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

7.9.1.3.1. Unterschiede zwischen den Verfettungsgraden

In der Literatur wurde keine vergleichbare Studie gefunden. In einer früheren Dissertation (GUBLER, 2012) wurden Lipidome verschiedener Kühe (mit und ohne FLS) mit weiteren Erkrankungen (z. B. Labmagenverlagerung) zu einem Zeitpunkt nach der Geburt untersucht. Hierbei konnten im Positiv-ESI-Modus verschiedene Massen festgestellt werden, die sich signifikant zwischen Holstein-Friesian-Kühen mit und ohne FLS sowie zwischen einzelnen Schweregraden unterschieden ($m/z = 268.999, 288.289, 383.119, 415.213, 462.352, 468.435, 520.340, 521.344, 533.329, 686.587, 758.588, 758.903, 784.580$ und 788.956). Die meisten Massen unterschieden sich nicht zwischen allen, sondern nur zwischen einzelnen Gruppen signifikant und bei der Gruppenanalyse wurden zwischen den einzelnen Verfettungsgraden Überschneidungen festgestellt.

Die Masse 758.90 konnte sowohl von GUBLER (2012) als auch in der vorliegenden Arbeit für Unterschiede im Lipidom zwischen den einzelnen Verfettungsgraden mitverantwortlich gemacht werden.

In der Arbeit von GUBLER (2012) wurden auch Chromatogramme identischer Proben, die aber mit unterschiedlichen Methoden (Bligh und Dyer, Folch und

MTBE) extrahiert wurden, verglichen und dabei festgestellt, dass die Chromatogramme der Extraktionen mehrheitlich übereinstimmten. Somit können auch Studien mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden untereinander verglichen werden, sofern andere Messparameter ebenfalls vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Vergleich mit GUBLER (2012) zusätzlich der peripartale Verlauf des Lipidoms bzw. Metaboloms untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede im peripartalen Lipidomvergleich. Es konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Transitphase Lipide wie Cholesterole, Phosphocholine und Lysophosphocholine, mit Ausnahme des Zeitpunkts um die Geburt, stets in ihren Konzentrationen zunahmen und Triacylglycerole nur vor der Geburt teilweise wenig zunahmen und nach der Geburt stark absanken und auch tief blieben. Für die peripartalen Unterschiede im Lipidom waren 40 Massen verantwortlich, für diejenigen zwischen den histologischen Schweregraden 20 Massen.

ZHANG et al. (2013) führten eine Plasma-Metabolomik-Studie bei Milchkühen, die entweder gesund waren oder eine (sub-)klinische Ketose aufwiesen, durch. Dabei fanden sie statistisch signifikante Unterschiede einzelner Metaboliten zwischen diesen drei Gruppen, die in Zukunft als mögliche Biomarker einer Ketose verwendet werden könnten. Dabei lagen 9 Metaboliten (Milchsäure, Glucuronsäure, L-Alanin, Glykolsäure, Ribitol, Pyroglutamatsäure, Galactose, 2,3,4-Trihydroxybutyrat und Glucose) in der Gruppe der subklinischen und klinischen Ketose in tieferen Konzentrationen vor als in der gesunden Kontrollgruppe. Sechzehn Metaboliten lagen in einer höheren Konzentration vor (Glycin, L-Isoleucin, α -Amino-Butyrat, Aminomalonsäure, α -Tocopherol, Sito-sterol, 3-Hydroxy-3-Methylglutarsäure, 3-Hydroxyvaleriansäure, Palmitinsäure, Heptadecansäure, Stearinsäure, 3-Hydroxybutyrat, Trans-9-octadecensäure, Myristinsäure, Cis-9-Hexadecensäure, 2-Piperidincarboxylsäure). Die Beprobung erfolgte dabei einmalig innerhalb der ersten 12 Stunden post partum. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurde bei ZHANG (2013) keine Verlaufsuntersuchung durchgeführt. Es

wurde nicht direkt die Leberverfettung untersucht, sondern es wurden die klinische und subklinische Ketose verglichen. Die Tiere wurden anhand der BHB-Konzentration, einer einmaligen Blutentnahme sowie klinischen Daten eingeteilt.

7.9.1.3.2. Verlauf während der Transitphase

VAN DEN TOP et al. (2005) stellten postpartal ebenfalls tiefere TAG-Werte fest. Kühe mit einem FLS zeigten einen stärkeren Rückgang der TAG-Werte als solche ohne FLS. Sie begründeten den Rückgang mit einer erhöhten Aktivität der Lipoprotein-Lipase im Fettgewebe. Die Lipoprotein-Lipase-Aktivität und der TAG-Gehalt im Plasma waren umgekehrt proportional. Dies erklärten die Autoren damit, dass die Lipoprotein-Lipase die Hydrolyse von TAG zu VLDL katalysiert und sie vermuteten, dass die erhöhte Aktivität dazu diene, die TAG vermehrt ins Euter zu schleusen (durch eine erhöhte mammmäre Lipoprotein-Lipase-Aktivität). Als Alternative erwähnten sie eine verminderte Konzentration von ApoB100 mit nachfolgend reduziertem VLDL-Export aus der Leber, wobei VLDL als Hauptträger für TAG gelten.

7.9.2. Metabolomik

7.9.2.1. Vorgehen Metabolomik

Wird, wie im vorliegenden Fall, eine Extraktion mit MTBE, Methanol und Wasser durchgeführt, kann mittels einer Extraktionsmethode sowohl eine Lipidomik als auch eine Metabolomik durchgeführt werden. Das ist ideal für kleine Probenmengen (CHEN et al., 2013). Dieses Vorgehen hat sich für den vorliegenden Versuch bewährt.

7.9.2.2. Diskussion der Versuchsergebnisse

Beim Vergleich aller Proben jedes Tieres mittels Gruppenanalyse konnte eine Aufteilung in 3 Gruppen festgestellt werden. Im Rahmen dieser Studie konnten

keine Gründe dafür eruieren werden. Es wurden mehrere Kriterien zwischen den 3 Gruppen untersucht und dabei festgestellt, dass die folgenden Kriterien nicht für die Aufspaltung verantwortlich waren, da diese jeweils in mehreren oder allen Gruppen vorkamen bzw. da jeweils nicht alle Tiere einer Gruppe gleich stark betroffen waren: Kalziumgabe (parenteral und per os), postpartale BCS-Abnahme, Alter, Grad der Leberverfettung, Lahmheit, andere klinische Erkrankungen (Mastitis, Metritis) und die Gabe von Medikamenten. Ein systematischer Fehler bei der Projektdurchführung kann praktisch ausgeschlossen werden, denn die Durchführung der Metabolomik wurde mehrfach überprüft und randomisiert. Zudem fanden die Probenentnahmen über einen längeren Zeitraum (sechs Monate) statt und jedes Tier wurde über sechs Wochen sieben Mal beprobt, so dass sich die Varianz zwischen den einzelnen Probenentnahmen ausgleichen sollte. Somit ist es möglich, dass der Unterschied dieser drei Gruppen im Metabolom liegt. Die Ursachen für diese metabolomischen Unterschiede sind derzeit jedoch nicht bekannt. Deswegen ist es wichtig, die für die Unterschiede verantwortlichen Massen zu identifizieren und biologisch zu interpretieren.

7. 10. Schlussfolgerungen

Durch die Kombination der Trennungskraft eines Chromatographen mit der Massengenauigkeit eines Massenspektrometers können Lipidarten unterschiedlichster Klassen detektiert und Lipidgruppen (TAG, Cholesterole, Lysophosphocholine, Phosphocholine) zugeordnet werden. So kann ein aktueller Überblick über alle in einer Plasmaprobe vorhandenen Lipide geschaffen werden. Eine grosse technische Herausforderung der Lipidomik besteht im Umgang mit grossen Datenmengen, die aus diesen Untersuchungen hervorgehen. Trotz einiger Schwierigkeiten ist die Lipidomik auf dem Weg dazu, ein wertvolles Forschungswerkzeug auf dem Gebiet der metabolischen Erkrankungen zu werden.

Resultate der vorliegenden Studie zeigen, dass bezüglich Leberverfettung, bei gesunden und erkrankten Kühen, postpartal Unterschiede, sowohl im Lipidom als auch im Metabolom, vorlagen. Diese Arbeit rechtfertigt also eine weitere Suche nach potentiellen Biomarkern für die Diagnose eines FLS. Bei der Einteilung der Tiere in verschiedene Verfettungsgrade muss bedacht werden, dass alle Tiere bezüglich Leberverfettung klinisch gesund waren und keine Symptome zeigten. Nur die histologische Diagnose war für die Einteilung ausschlaggebend. Es wäre deshalb interessant, dieselbe Untersuchung auch mit Tieren durchzuführen, die an einem klinischen FLS leiden und diese Resultate mit subklinischen Patienten zu vergleichen.

In der vorliegenden Studie standen die Ergebnisse des peripartalen Metaboliten-Verlaufs im Vordergrund. Zusätzlich konnte eine vage Aussage über Unterschiede im Lipidom/Metabolom zwischen unterschiedlichen subklinischen Leberverfettungsgraden gemacht werden.

Es wäre wünschenswert, die vorliegende Studie durch eine Reihe weiterer Versuche mit einer grösseren Anzahl an Versuchstieren durchzuführen; da die Aussagekraft der Ergebnisse von tierexperimentellen Studien umso höher ist, je mehr Probanden in einer Untersuchung unter möglichst kontrollierten Bedingungen eingesetzt werden. Eine Verlaufsuntersuchung soll als Versuchsaufbau beibehalten werden. So können mögliche Biomarker validiert werden. Dazu werden die Versuche optimalerweise parallel in verschiedenen Laboratorien durchgeführt, um Einflüsse durch einzelne Untersucher und Labors zu minimieren. Benötigt werden dafür qualifizierte interne Standards, behutsames Probenhandling und geeignete Geräte. Zudem sollte auf eine Prozess-Standardisierung (Lipidextraktion, Instrumente, Datenverarbeitungsprozess) nicht verzichtet werden. Um individuelle Komponenten in einem Substanzgemisch besser identifizieren zu können, ist beispielsweise eine MS/MS-Studie nötig, um unter anderem Doppelbindungen lokalisieren oder die Länge von Kohlenstoffketten bestimmen zu können.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ABDEL-RAHEEM, S., M. SCHREINER and C. IBEN (2010): Lactational and seasonal variations in plasma fatty acids profiles in dairy cows. *Vet. Med. Austria* 97, 149-156.

ADEWUYI, A. A., E. GRUYS and F. J. C. M. VAN EERDENBURG (2005): Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet. Quart.* 27, 117-126.

ALLEN, M. S., B. J. BRADFORD and M. OBA (2009): The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci* 87, 3317-3334.

ALLEN, M. S. and P. PIANTONI (2013): Metabolic control of feed intake – implications for metabolic disease of fresh cows. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 279-297.

ANDRES CONTRERAS, G. and L. M. SORDILLO (2011): Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34, 281-289.

ASTARITA, G., F. AHMED and D. PIOMELLI (2009): Lipidomic analysis of biological samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Meth. Mol. Biol.* 579, 201-219.

BEAM, S. W. and W. R. BUTLER (1997): Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133-142.

BERTONI, G. and E. TREVISI (2013): Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 413-431.

BLIGH, E. G. and W. J. DYER (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

BOBE, G., J. W. YOUNG and D. C. BEITZ (2004): Invited review: Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. J. Dairy Sci. 87, 3105-3124.

BOBE, G., V. R. AMIN, A. R. HIPPEN, P. SHE, J. W. YOUNG and D. C. BEITZ (2008): Non-invasive detection of fatty liver in dairy cows by digital analyses of hepatic ultrasonograms. J. Dairy Res. 75, 84-89.

BRAUN, U. (2009): Ultrasonography of the liver in cattle. Vet Clin Food Anim. 25, 591-609.

BROCKMAN, R. P. (1990): Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. Br. J. Nutr. 64, 95-101.

BUTLER, S. T., A. L. MARR, S. H. PELTON, R. P. RADCLIFF, M. C. LUCY and W. R. BUTLER (2003): Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: Effects on expression of IGF-1 and GH receptor 1A. J. Endocrinol. 176, 205-217.

CASTRO-PEREZ, J. M., J. KAMPHORST, J. DEGROOT, F. LAFEBER, J. GOSHAWK, K. YU, J. P. SHOCKOR, R. J. VREEKEN and T. HANKEMEIER (2010): Comprehensive LC-MSE lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. J. Proteome Res. 9, 2377-2389.

CHEN, S., M. HOENE, J. LI, Y. LI, X. ZHAO, H.-U. HÄRING, E. D. SCHLEICHER, C. WEIGERT, G. XU and R. LEHMANN (2013): Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl *tert*-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1298, 9-16.

CLAUSS, W. und C. CLAUSS (2005): Grundlagen des Lebens. In: Zoologie für Tiermediziner. Enke Verlag, Stuttgart, 2.

COMIN, A., D. GERIN, A. CAPPA, V. MARCHI, R. RENAVILLE, M. MOTTA, U. FAZZINI, A. PRANDI (2002): The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. *Theriogenology* 58, 899-910.

DE KOSTER, J. D. and G. OPSOMER (2013): Insulin resistance in dairy cows. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 299-322.

DETTMER, K., P. A. ARONOV and B. D. HAMMOCK (2007): Mass-spectrometry based metabolomics. *Mass spectrom. Rev.* 26, 51-78.

DIRKSEN, G., H.-D. GRÜNDER und M. STÖBER (2006): *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 5. Auflage. Parey-Verlag, Stuttgart, 648-649 / 431/ 433 / 1245.

DONKIN, S. S. and L. E. ARMENTANO (1995): Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. *J. Anim. Sci.* 73, 546-551.

DRACKLEY, J. K., M. J. RICHARD, D. C. BEITZ and J. W. YOUNG (1992): Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-butanediol. *J. Dairy Sci.* 75, 1622-1634.

DRACKLEY, J. K. (1999): Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259-2273.

DRACKLEY, J. K., T. R. OVERTON, G. N. DOUGLAS (2001): Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84, E100-112.

DUNTEMAN, G. H. (1989): *Principle component analysis*. Sage Publications, Newbury Park, California, 5.

EATON, S., K. BARTLETT and M. POURFARZAM (1996): Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320, 345-357.

EDMONSON, A. J., I. J. LEAN, L. D. WEAVER, T. FARVER and G. WEBSTER (1989): A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 72, 68-78.

EINSPANIER, R., A. MIYAMOTO, D. SCHAMS, M. MÜLLER and G. BREM (1990): Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrus cycle and pregnancy of cows. J. Reprod. Fert. 90, 439-445.

EJSING, C. S., P. HUSEN and K. TARASOV (2012): Lipid Informatics: From a Mass Spectrum to Interactomics. In: Lipidomics - Technologies and Applications. 1. Auflage, Hrsg. Kim Ekroos, Wiley-VCH, Weinheim, 166.

EMERY, R. S., J. S. LIESMAN and T. H. HERDT (1992): Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. Conference: Hepatic Metabolism of Organic Acids in Ruminants, 832-837.

FOLCH, J., M. LEES and G. H. SLOANE STANLEY (1956): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509.

GAAL, T., I. M. REID, R. A. COLLINS, C. J. ROBERTS and B. V. PIKE (1983): Comparison of biochemical and histological methods of estimating fat content of liver of dairy cows. Res. Vet. Sci. 34, 245-248.

GÄRTNER, H. und H. GASCHA (2008): Prozentrechnung und Zinsrechnung. In: Formelsammlung - Mathematik, Physik, anorganische Chemie. 1. Auflage, Compact Verlag, München, 27.

GEELEN, M. J. H. and T. WENSING (2006): Studies on hepatic lipidosis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the „Utrecht fatty liver model of dairy cows“. Vet. Quart. 28, 90-104.

GEY, M. H. (2008): Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 272-274.

GIBBONS, G. F. and D. WIGGINS (1995): Intracellular triacylglycerol lipase: its role in the assembly of hepatic very-low-density lipoprotein (VLDL). *Advan. Enzyme Regul.* 35, 179-198.

GOFF, J. P. and J. R. STABEL (1990): Decreased plasma retinol, α -tocopherol and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J. Dairy Sci.* 73, 3195-3199.

GOFF, J. P. and R. L. HORST (1997): Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.

GORDON, J. L., S. J. LEBLANC and T. F. DUFFIELD (2013): Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 433-445.

GRABER, M., S. KOHLER, T. KAUFMANN, M. G. DOHERR, R. M. BRUCKMAIER and H. A. VAN DORLAND (2010): A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *J. Dairy Sci.* 93, 5200-5215.

GRIFFITHS, W. J., T. KOAL, Y. WANG, M. KOHL, D. P. ENOT und H. P. DEIGNER (2010): „Targeted Metabolomics“ in der Biomarkerforschung. *Angew. Chemie, Germ. Edition.* 122, 5554-5575.

GRUFFAT, D., D. DURAND, B. GRAULET and D. BAUCHART (1996): Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 375-389.

GRUM, D. E., J. K. DRACKLEY, R. S. YOUNKER, D. W. LACOUNT and J. J. VEENHUIZEN (1996): Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79, 1850-1864.

GRUMMER, R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.

GRUMMER, R. R. (1995): Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73, 2820-2833.

GRUMMER, R. R., D. G. MASHEK and A. HAYIRLI (2004): Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. Food. Anim.* 20, 447-470.

GRUMMER, R. R. (2010): Managing the transition cow – emphasis on ketosis and fatty liver syndrome. Proceedings of the Western Canadian Nutrition Conference, Saskatoon, Saskatchewan, Ca, 1.

GUBLER, M. (2012): Untersuchung des Lipidoms bei Kühen mit Leberverfettung und bei gesunden Kühen. Dissertation, Universität Zürich.

HASKELL, S. R. R. (2008): Analytical Testing. In: *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 44-45.

HAYIRLI, A., R. R. GRUMMER, E. V. NORDHEIM and P. M. CRUMP (2002): Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 85, 3430-3443.

HERDT, T. H. (2000): Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 215-230.

HERDT, T. H. and B. J. GERLOFF (2008): Fatty liver in dairy cattle. In: *Current Veterinary Therapy 5: Food Animal Practice*, Eds. D. E. Anderson, D. M. Rings. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 146-149.

HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH (2012): Spektrometrische Methoden in der organischen Chemie. 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 271-272 / 285.

HOLTENIUS, K., S. AGENÄS, C. DELAVAUD and Y. CHILLIARD (2003): Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J. Dairy Sci.* 86, 883-891.

HORST, R. L. and N. A. JORGENSEN (1982): Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *J. Dairy Sci.* 65, 2332-2337.

HU, C., R. VAN DER HEIJDEN, M. WANG, J. VAN DER GREEF, T. HANKEMEIER and G. XU (2009): Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *Journal of Chromatography B* 877, 2836-2846.

HUZZLEY, J. M. and T. R. OVERTON (2008): Early predictors of transition cow disorders. Dept. of Anim. Sci. Cornell University Proceedings, Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 67-76.

INGVARTSEN, K. L. and J. B. ANDERSEN (2000): Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83, 1573-1597.

JORRITSMA, R., H. JORRITSMA, Y. H. SCHUKKEN and G. H. WENTINK (2000): Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology* 54, 1065-1074.

JORRITSMA, R., T. WENSING, T. KRUIP, P. VOS and J. NOORDHUIZEN (2003): Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34, 11-26.

JUNG, H. R., T. SYLVÄNNE, K. M. KOISTINEN, K. TARASOV, D. KAUHANEN and K. EKROOS (2011): High throughput quantitative molecular lipidomics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 925-934.

KALAITZAKIS, E., N. ROUBIES, N. PANOUSIS, K. POURLIOTIS, E. KALDRYMIDOU and H. KARATZIAS (2007): Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 835-845.

KALAITZAKIS, E., N. PANOUSIS, N. ROUBIES, N. GIADINIS, E. KALDRYMIDOU, M. GEORGIADIS and H. KARATZIAS (2010): Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. *Can. Vet. J.* 51, 615-622.

KARSAI, F. und M. SCHÄFER (1984): Diagnostische Erfahrungen bei metabolisch bedingten Leberkrankheiten der Milchkühe. *Mh. Vet. Med.* 39, 181-186.

KATOH, N. (2002): Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 293-307.

KEHRLI, M. E. JR., J. P. GOFF, J. A. HARP and J. R. THURSTON (1990): Effects of preventing periparturient hypocalcemia in cows by parathyroid hormone administration on hematology, conglutinin, immunoglobulin and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.* 73, 2103-2111.

KHALIL, M. B., W. HOU, H. ZHOU, F. ELISMA, L. A. SWAYNE, A. P. BLANCHARD, Z. YAO, S. A. L. BENNETT and D. FIGEYS (2010): Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews* 29, 877-929.

KIRWAN, J. (2013): Metabolomics for the practising vet. *In Practice* 35, 438-445.

KLIEVE, A. V., D. HENNESSY, D. OUWERKERK, R. J. FORSTER, R. I. MACKIE and G. T. ATTWOOD (2003): Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology* 95, 621-630.

LABOKLIN: Labor für klinische Diagnostik GMBH & Co. KG, Basel, Schweiz; www.laboklin.ch; letzte Aktualisierung: 2013.

LEAN, I. J., R. VAN SAUN and P. J. DEGARIS (2013): Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 337-366.

LEBLANC, S. J., K. E. LESLIE and T. D. DUFFIELD (2005): Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88, 159-170.

LEBLANC, S. (2010): Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56, 29-35.

LEROY, J., T. VANHOLDER, A. VAN KNEGSEL, I. GARCIA-ISPIERTO and P. BOLS (2008): Nutrient Prioritization in dairy cows early postpartum: Mismatch between metabolism and fertility. *J. Reprod. Dom. Anim.* 43, 96-103.

LI, M., Z. ZHOU, H. NIE, Y. BAI and H. LIU (2010): Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 1.

LIU, Y., Y. CHEN and M. CAMERON SULLARDS (2012): Targeted Lipidomics: Sphingolipidomics. In: *Lipidomics - Technologies and Applications*. 1. Edition, Ed. Kim Ekroos, Wiley-VCH, Weinheim, 77.

MATTHAN, N. R., B. IP, N. RESTEGHENI, L. M. AUSMAN and A. H. LICHTENSTEIN (2010): Long-term fatty acid stability in human serum cholesteryl ester, Triazylglyzerole, and phospholipid fractions. *J. Lipid Res.* 51, 2826-2832.

MATYASH, V. and G. LIEBISCH (2008): Lipid extraction by methyl-*tert*-butylether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49, 1137-1146.

MCART, J. A. A., D. V. NYDAM and G. R. OETZEL (2013): Dry period and parturient predictors of early lactation hyperketonemia in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 96, 198-209.

MILLS, S. E., D. C. BEITZ and J. W. YOUNG (1986): Characterization of metabolic changes during a protocol for inducing lactation ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69, 352-361.

MIZUTANI, H., T. SAKO, Y. TOYODA, T. KAWABATA, N. URUMUHANG, H. KOYAMA and S. MOTOYOSHI (1999): Preliminary studies on hepatic carnitine palmitoyltransferase in dairy cattle with or without fatty liver. *Vet. Res. Commun.* 23, 475-480.

MOHAMED, T., S. OIKAWA, T. KUROSAWA, K. TAKEHANA, Y. HOSAKA, H. OKADA, M. KOIWA and H. SATO (2004): Focal fatty liver in a heifer: utility of ultrasonography in diagnosis. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 341-344.

MOLGAARD, L., B. M. DAMGAARD, V. BJERRE-HARPOPTH and M. S. HERSKIN (2012): Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behaviour. *Research in Veterinary Science* 93, 1248-1254.

NEBEL, R. L. and M. L. MCGILLIARD (1993): Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3257-3268.

NG, W. K. and I. O. L. NG (1996): Focal fatty change: a rare hepatic manifestation of diabetes mellitus. *HKMJ* 2, 99-101.

NIELSEN, N. I., K. L. INGVARTSEN and T. LARSEN (2003): Diurnal variation and the effect of feed restriction on plasma and milk metabolites in TMR-fed dairy cows. *J. Vet. Med. A* 50, 88-97.

NIELSEN, N. I. and K. L. INGVARTSEN (2004): Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology* 115, 191-213.

NORDSTRÖM, A. and R. LEWENSOHN (2010): Metabolomics: Moving to the clinic. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5, 4-17.

OLDICK, B. S. (1999): Effect of level and source of energy during the periparturient period on reproductive performance. Tri-State Dairy Nutrition Conference, Indiana, April 20-21, 1999.

OSPINA, P. A., J. A. MCART, T. R. OVERTON, T. STOKOL and D. V. NYDAM (2013): Using nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 387-412.

PIECHOTTA, M., A. K. SANDER, J. P. KASTELIC, R. WILDE, M. HEPPELMANN, B. RUDOLPHI, H. J. SCHUBERTH, H. BOLLWEIN and M. KASKE (2012): Short communication: Prepartum plasma insulin-like growth factor-I concentrations based on day of insemination are lower in cows developing postpartum diseases. *J. Dairy Sci.* 95, 1367-1370.

PIECHOTTA, M., K. KEDVES, M. G. ARAUJO, A. HÖFLICH, F. METZGER, M. HEPPELMANN, A. MUSCHER-BANSE, C. WRENZYCKI, C. PFARRER, H. J. SCHUBERTH, M. HOEDEMAKER, H. BOLLWEIN and M. KASKE (2013): Hepatic mRNA expression of acid labile subunit and deiodinase 1 differs between cows selected for high versus low concentrations of insulin-like growth factor 1 in late pregnancy. *J. Dairy Sci.* 96, 3737-3749.

PLAIZIER, J. C., D. O. KRAUSE, G. N. GOZHO and B. W. McBRIDE (2009): Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176, 21-31.

REHAGE, J., A. STARKE, M. HÖLTERSHINKEN and M. KASKE (2006): Hepatic lipidoses: Diagnostic tools and individual and herd risk factors. 24. World Buiatrics Congress 2006, Nice, France.

REICHENBÄCHER, M. und J. POPP (2007): *Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen*. 1. Auflage. Teubner Verlag, Wiesbaden, 3.

RICHTER, G. (2003): *Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken*. Thieme Verlag, Stuttgart, 41.

ROBERTS, L. D., G. McCOMBIE, C. M. TITMAN and J. L. GRIFFIN (2008): A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *J. Chromatogr. B* 871, 174-181.

ROBERTS, T., N. CHAPINAL, S. J. LEBLANC, D. F. KELTON, J. DUBUC and T. F. DUFFIELD (2012): Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J. Dairy Sci.* 95, 3057-3063.

ROCHE, J. R., J. K. KAY, N. C. FRIGGENS, J. J. LOOR and D. P. BERRY (2013): Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 323-336.

ROGIERS, V. (1978): Stability of the long chain non-esterified fatty acid pattern in plasma and blood during different storage conditions. *Clinica Chimica Acta* 84, 49-54.

RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and M. J. H. GEELEN (1998): Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 81, 2904-2911.

RUKKWAMSUK, T., T. A. M. KRUIP, G. A. L. MEIJER and T. WENSING (1999a): Hepatic fatty acid composition in periparturient dairy cows with fatty liver induced by intake of a high energy diet in the dry period. *J. Dairy Sci.* 82, 280-287.

RUKKWAMSUK, T., T. A. M. KRUIP and T. WENSING (1999b): Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Quart.* 21, 71-77.

SCALBERT, A., L. BRENNAN, O. FIEHN, T. HANKEMEIER, B. S. KRISTAL, B. VAN OMMEN, E. PUJOS-GUILLOT, E. VERHEIJ, D. WISHART and S. WOPEREIS (2009): Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5, 435-458.

SCHMELZER, K., E. FAHY, S. SUBRAMANIAM and E. A. DENNIS (2007): The lipid maps initiative in lipidomics. *Method. Enzymol.* 432, 171-183.

SEPPÄNEN-LAAKSO, T. and M. ORESIC (2009): How to study lipidomes. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 185-190.

SHELDON, I. M., D. E. NOAKES, A. N. RYCROFT, D. U. PFEIFFER and H. DOBSON (2002): Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123, 837-845.

SORDILLO, L. M. and W. RAPHAEL (2013): Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Vet. Clin. Food Anim.* 29, 267-278.

SPAIN, J. N. and W. A. SCHEER (2002): The 100-day contract with the dairy cow: 30 days prepartum to 70 days postpartum. *Advances in Dairy Technology* 14, 19-42.

SPICER, L. J., W. B. TUCKER and G. D. ADAMS (1990): Insulin-like growth factor-I in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity and estrous behavior. *J. Dairy Sci.* 73, 929-937.

STANGASSINGER, M. (2011): Gibt es für Milchkühe eine Leistungsgrenze? Anmerkungen aus physiologischer Sicht. *Tierärztl. Prax.* 39 (G), 253-261.

STARKE, A., A. HAUDUM, G. WEIJERS, K. HERZOG, P. WOHLSEIN, M. BEYERBACH, C. L. DE KORTE, J. M. THIJSEN and J. REHAGE (2010): Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *J. Dairy. Sci.* 93, 2952-2965.

STENGÄRDE, L., M. TRAVEN, U. EMANUELSON, K. HOLTENIUS, J. HULTGREN and R. NISKANEN (2008): Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Vet. Scand.* 50, 31.

STENGÄRDE, L., K. HOLTENIUS, M. TRAVEN, J. HULTGREN, R. NISKANEN and U. EMANUELSON (2010): Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *J. Dairy Sci.* 93, 4691-4699.

VAN DEN TOP, A. M., M. J. H. GEELLEN, T. WENSING, G. H. WENTINK, A. T. VAN T'KLOSTER and A. C. BEYNEN (1996): Higher postpartum hepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with lower activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase. *J. Nutr.* 126, 76-85.

VAN DEN TOP, A. M., A. VAN TOL, H. JANSSEN, M. J. H. GEELLEN and A. C. BEYNEN (2005): Fatty liver in dairy cows post partum is associated with decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Dairy Res.* 72, 129-137.

VAN DORLAND, H. A., S. RICHTER, I. MOREL, M. G. DOHERR, N. CASTRO and R. M. BRUCKMAIER (2009): Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1924-1940.

VAN DORLAND, H. A. and R. M. BRUCKMAIER (2010): Regional mRNA expression of key gluconeogenic enzymes in the liver of dairy cow. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94, 505-508.

VAN MEER, G. (2005): Cellular lipidomics. *The EMBO Journal*. 24: 3159-3165.

VEENHUIZEN, J. J., J. K. DRACKLEY, M. J. RICHARD, T. P. SANDERSON, L. D. MILLER and J. W. YOUNG (1991): Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74, 4238-4253.

VEENHUIZEN, J. J., J. K. DRACKLEY, M. J. RICHARD, T. P. SANDERSON, L. D. MILLER and J. W. YOUNG (1991): Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74, 4238-4253.

VERNON, R. G. (2005): Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* 72, 460-469.

WANG, X., X. LI, C. ZHAO, P. HU, H. CHEN, Z. LIU, G. LIU and Z. WANG (2012): Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2386-2392.

WEBER, C., A. HAMETHER, A. TUSCHERER, B. LOSAND, E. KANITZ, W. OTTEN, S. P. SINGH, R. M. BRUCKMAIER, F. BECKER, W. KANITZ, H. M. HAMMON (2013): Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 165-180.

WENK, M. R. (2005): The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4, 594-610.

WILDMAN, E. E., G. M. JONES, P. E. WAGNER and R. L. BOMAN (1982): A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65, 495-501.

WILHELM, K., J. WILHELM und M. FÜRLI (2013): Vergleichende Betrachtung ausgewählter Blutparameter von Hochleistungskühen bei unterschiedlichen Entnahmestellen. Tierärztl. Prax. 41 (G), 7-14.

WOLLHEIM, C. B. and G. W. G. SHARP (1981): Regulation of insulin release by calcium. Physiol. Rev. 61, 914-973.

ZHANG, Q., G. WANG, Y. DU, L. ZHU and J. A (2007): GC/MS analysis of the rat urine for metabonomic research. J. Chromatogr. B 854, 20-25.

ZHANG, H., L. WU, C. XU, C. XIA, L. SUN and S. SHU (2013): Plasma metabolomic profiling of dairy cows affected with ketosis using gas chromatography/mass spectrometry. BMC Vet. Res. 9, 186.

ZIMMERMANN, R. und T. STREIBEL (2006): Massenspektrometrie. In: Prozessanalytik. Hrsg. R. W. Kessler, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Kap. 5.6.3.2 Ionenquelle, 194.

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich bedanken:

- Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun für die Übernahme des Referats, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die Korrektur der Dissertation
- Herrn Dr. C. Gerspach, Oberarzt Nutztiermedizin, für die Leitung und wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation, die Hilfsbereitschaft, Geduld und Unterstützung während der ganzen Arbeit und speziell während der Probenentnahmen
- Herrn Sandro Imhasly bei der Durchführung der Laborarbeiten und der Datenauswertung sowie -interpretation
- Frau Franziska Rügsegger, Abteilung Ambulanz und Bestandesmedizin der Nutztierklinik, Universität Zürich, für die Hilfe bei der Probenentnahme und die veterinärmedizinische Betreuung des Landwirtschaftsbetriebs
- Familie Traugott Wegmann für die freundliche und zuverlässige Unterstützung und die Zurverfügungstellung ihrer Kühe für die Untersuchungen
- Laura Nyström, Linda Münger, Selina Oppliger und Samy Boulos für die Zurverfügungstellung des Massenspektrometers und die Unterstützung bei der Durchführung der Massenspektrometrie
- Frau Maja Rütten für die histologische Untersuchung der Leberbiopsien
- Frau Brigitte König für die Unterstützung bei der Bestimmung der NEFA- und BHB-Konzentrationen.

11. ANHANG

Anhang 1: Krankheiten, Behandlungen und Proben, die innerhalb bestehender Absetzfristen entnommen wurden.

Tier	Diagnose(n)	Medikament (Wirkstoffe)	Anwen- dung	Absetz - frist	Betr. Proben
2	Hypo- kalzämie	Calcitat (Aminoethyldihydro- genphosphat, Calcium- borogluconat, Calciumgluconat, Calciumhydroxid, Magnesiumchlorid)	Einmalig	Keine	Keine
6	Hypo- kalzämie, Metritis	Calcitat	Einmalig	Keine	+0/+7
		Tetrabiotic (Tetracyclin)	Einmalig	6d	
		Rifen (Ketoprofen)	Einmalig	1d	
		Cobactan 2.5 % (Cefquinom)	3d	5d	
		Flunixin (Flunixin)	Einmalig	5d	
7	Hypo- kalzämie, Karpal- abszess	Calcitat	Einmalig	Keine	Keine

8	Hypo- kalzämie, Klauen- probleme	Calcitat	Einmalig	Keine	Keine
9	Hypo- kalzämie, Klauen- probleme	Bovikalc-Bolus (Calciumchlorid, Calciumsulfat, Essigsäureester von Mono- und Diglyceriden von Fettsäuren)	Mehr- malig	Keine	Keine
10	Hypo- kalzämie, Karpal- abszess	Bovikalc-Bolus	Mehr- malig	Keine	Keine
11	Coli- Mastitis	NeoM-Salbe (Neomycin, Penicillin G-Procaïn, Retinol)	4d	5d	+14
13	Hypo- kalzämie, Retentio secun- darium	Calcitat	Einmalig	Keine	+7
		Engemycin (Oxytetracyclin)	3d	10d	
		Tetrabiotic	Einmalig	6d	
		Rifen	Einmalig	4d	

Anhang 2: Exakte Daten der Blutentnahme in Bezug auf den Tag der Geburt

	Probennummer (in Relation zum Tag der Geburt)						
Kuh	1 (-14)	2 (-7)	3 (0)	4 (+7)	5 (+14)	6 (+21)	7 (+28)
1	-14	-7	1	7	14	21	28
2	-10	-3	0	6	13	20	28
4	-14	-7	0	7	14	21	28
5	-12	-5	2	9	16	23	30
6	-9	-2	1	8	15	22	29
7	-15	-8	2	9	16	23	30
8	-10	-3	0	8	15	22	29
9	-11	-4	2	10	17	24	31
10	-12	-5	1	9	16	23	30
11	-14	-7	0	6	14	21	28
13	-14	-8	0	7	14	21	28
14	-11	-4	0	7	14	21	28
Median (Min./ Max.)	-12 (-15/-9)	-5 (-8/-2)	0.5 (0/2)	7.5 (6/10)	14.5 (13/17)	21.5 (20/24)	28.5 (28/31)

Anhang 3: Übersicht über den BCS-Verlauf

Kuh	BCS -14	BCS -7	BCS 0	BCS 7	BCS 14	BCS 21	BCS 28
1	3	3	3	2.75	2.75	2.5	2.5
2	4	4	3.75	3.25	3.25	3.25	3.25
4	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25	3
5	3.75	3.75	3.5	3.5	3.5	3.25	3.25
6	3.5	3.5	3.25	3	2.75	2.75	3
7	3.75	3.5	3.25	2.75	2.75	3	2.25
8	4	4.5	3.75	4.25	3.75	3.5	3.75
9	4.5	4.5	4.5	3.75	3.75	3.5	2.75
10	3.75	4	3.25	3.75	3.75	3.25	2.75
11	3.25	3.5	3.5	3.25	2.25	1.75	1.25
13	4.25	4	4.25	3.75	3.75	3	3.5
14	4.5	4.75	4.75	3.75	4.25	4	4
Median (Min./ Max.)	3.75 (3/ 4.5)	3.88 (3/ 4.75)	3.5 (3/ 4.75)	3.38 (2.75/ 4.25)	3.38 (2.75/ 4.25)	3.25 (1.75/ 4)	3.0 (1.25/ 4)

Anhang 4: NEFA-Peak und NEFA-Anstieg in Abhängigkeit der Leberverfettung

Tier	Verfettungs- grad	NEFA-Peak	1. NEFA- Anstieg	Steilster NEFA- Anstieg
1	3	0.91	-14 zu -7	1.84
2	3	0.93	-7 zu 0	5.02
4	2	0.79	-14 zu -7	2.86
5	2	0.72	-14 zu -7	2.20
6	1	0.76	-7 zu 0	1.48
7	2	1.00	-7 zu 0	3.65
8	2	0.87	-14 zu -7	4.37
9	2	0.81	-7 zu 0	1.85
10	2	0.91	-7 zu 0	1.53
11	2	0.91	-14 zu -7	3.67
13	3	0.93	-14 zu -7	1.27
14	3	0.83	-14 zu -7	1.55

Anhang 5: Von verschiedenen Autoren vorgeschlagene Maximalwerte für die NEFA- und BHB-Konzentrationen

Autor, Jahr	NEFA (mmol/l)	BHB (µmol/l)	Entnahmeort
Bertoni & Trevisi, 2013	ap: 0.03-0.46 pp: 0.01-0.52	ap: 120 - 400 pp: 160 - 650	Jugularvene
Ospina et al., 2013	ap: < 0.3 pp: < 0.7	ap: < 600 pp: < 1000	Unspezifisch
Laboklin, 2013	0.1 – 0.5	< 600	Unspezifisch
Roberts, 2012	ap: < 0.4 pp: < 0.8	ap: < 700 pp: < 1200 - 1600	Unspezifisch
Andres Contreras und Sordillo, 2011	ap: < 0.2 pp: < 1.0		Unspezifisch
Leblanc, 2010	ap: < 0.4	pp: <1200 - 1400	Unspezifisch
Stengärde, 2010	pp: < 0.35	pp: < 900	Jugular-/ Coccygealvene
Haskell, 2008	ap: < 0.4 pp: < 0.7	ap: < 960 pp: < 1400 Klin. Ketose > 2500	Unspezifisch
Adewuyi et al., 2005	ap: < 0.2 pp: < 0.7		Unspezifisch

ap: ante partum

pp: post partum